

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biochemie
Studijní obor: Biochemie



Marek Wilhelm

**Enkapsulace doxorubicinu a ellipticinu do apoferritinových
nanočástic**

**Encapsulation of doxorubicin and ellipticine into apoferritin
nanocarriers**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Konzultant práce: Mgr. Radek Indra, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení:

„Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitelky prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval. Dále prohlašuji, že tato bakalářská práce nebyla využita k získání jiného či stejného titulu.“

V Praze dne

Podpis:

Marek Wilhelm

Poděkování:

Touto cestou bych rád poděkoval paní prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za vedení při psaní této závěrečné práce. Dále také děkuji Mgr. Radku Indrovi, Ph.D. za podnětné rady, připomínky, vedení při experimentální části během práce a výsledky charakterizace stability připravených nanočástic. V neposlední řadě bych rád poděkoval kolegům z Laboratoře metalomiky a nanotechnologie Mendelovy univerzity v Brně za výsledky charakterizace velikosti apoferritinové nanočástice s enkapsulovaným ellipticinem. Rovněž bych rád poděkoval své rodině za podporu během psaní této bakalářské práce.

Práce byla podporována grantovou agenturou ČR (grant 17-12816S).

Abstrakt:

Nádorové onemocnění je druhou nejčastější příčinou úmrtí v ČR, hned po kardiovaskulárních chorobách. Relativně nový a velice se rozrůstající vědní obor nanomedicína přinesla nový náhled na možnosti studia nádorového onemocnění pomocí nanotransportérů. Uložení léčiva do nanotransportéru může zlepšit vlastnosti a distribuci cytostatika, zejména snížit vedlejší účinky daného cytostatika na okolní zdravou tkáň. Tato práce studovala nanotransportér apoferritin (*apo-forma ferritinu*) jako velice slibného kandidáta pro klinické využití. Studována byla optimalizace přípravy apoferritinových nanotransportérů se dvěma různými cytostatiky – doxorubicinu a ellipticinu. Dále byl podrobněji charakterizován apoellipticin z hlediska jeho fyzikálně – chemických vlastností (*stabilita a velikost*). Získané výsledky ukazují slibný potenciál pro klinické použití apodoxorubicinu i apoellipticinu.

Klíčová slova

protinádorová léčiva, doxorubicin, ellipticin, nanomedicína, nanočástice, apoferritin

Abstract:

Tumor disease is the second most common cause of death in the Czech Republic, right after cardiovascular diseases. The relatively new and growing science field of nanomedicine brought a new insight into the possibilities of studying the tumor diseases with nanotransporters. The encapsulation of the drug into the nanotransponers can improve the properties and distribution of the cytostatics, in particular to reduce the side effects of the cytostatics on the surrounding healthy tissue. This work studied nanotransporter apoferritin (*apo-form of ferritin*) as a very promising candidate for the clinical use. Optimization of the preparation of apoferritin nanotransporters with two different cytostatics – doxorubicin and ellipticine was studied. Furthermore, apoellipticine was characterized in more detail in terms of its physicochemical properties (*stability and size*). The results obtained show promising potential of these nanocarriers for the clinical use.

Key words

anticancer drugs, doxorubicin, ellipticine, nanomedicine, nanocarriers, apoferritin

Obsah

1. Úvod.....	8
1.1 Incidence a mortalita nádorového onemocnění.....	8
1.2 Vznik a vývoj nádorového onemocnění	8
1.3 Obecné principy protinádorové léčby.....	9
1.4 Chemoterapie.....	11
1.4.1 Doxorubicin	12
1.4.2 Ellipticin	16
1.5 Využití nanotechnologie v protinádorové léčbě	20
1.5.1 Obecné strategie nanomedicíny	22
1.5.2 Potencionálně využitelné nanočástice v klinické praxi	23
1.5.3 Apoferritin	29
2. Cíl práce	31
3. Materiál a metody	32
3.1 Chemikálie.....	32
3.2 Přístroje	32
3.3 Metody.....	33
3.3.1 Příprava apodoxorubicinu (<i>ApoDox</i>)	33
3.3.2 Příprava apoellipticinu (<i>ApoElli</i>).....	36
3.3.3 Charakterizace stability ApoElli při -20 a 4 °C	39
3.3.4 Charakterizace velikosti ApoElli	40
4. Výsledky.....	41
4.1 Optimalizace přípravy nanotransportérů apoferritinu	41
4.1.1 Optimalizace přípravy apodoxorubicinu (<i>ApoDox</i>)	41
4.1.2 Optimalizace přípravy apoellipticinu (<i>ApoElli</i>)	45
4.2 Charakterizace ApoElli.....	49
4.2.1 Vliv teploty na stabilitu ApoElli	49
4.2.2 Charakterizace velikosti ApoElli	50
5. Diskuze.....	51
6. Závěr	53
7. Seznam použité literatury.....	54

Seznam použitých zkratk

Apo	apoferritin
ApoDox	doxorubicin enkapsulovaný do apoferritinu, apodoxorubicin
ApoElli	ellipticin enkapsulovaný do apoferritinu, apoellipticin
CNT	uhlíkové nanotrubice (<i>z angl. carbon nanotubes</i>)
CYP	cytochrom P450
Dox	doxorubicin
dsDNA	dvouvláknová DNA (<i>z angl. double-strand DNA</i>)
Elli	ellipticin
EPR	efekt zvýšené permeability a retence (<i>z angl. enhanced permeability and retention effect</i>)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (<i>z angl. US Food and Drug Administration</i>)
MWCNT	mnohovrstvé uhlíkové nanotrubice (<i>z angl. multi-walled carbon nanotubes</i>)
ROS	reaktivní formy kyslíku (<i>z angl. reactive oxygen species</i>)
ssDNA	jednovláknová DNA (<i>z angl. single-strand DNA</i>)
SWCNT	jednovrstvé uhlíkové nanotrubice (<i>z angl. single-walled carbon nanotubes</i>)
TEM	transmisní elektronová mikroskopie

1. Úvod

1.1 Incidence a mortalita nádorového onemocnění

Rakovina je druhá nejčastější příčina úmrtí v České republice, hned po kardiovaskulárních chorobách. Podle Národního onkologického registru ČR bylo v roce 2014 zaznamenáno celkem 92 262 nových případů zhoubných nádorů. V roce 2015 pak 94 465, tedy přibližně o 2 200 nových případů více. Úmrtnost na maligní nádory v ČR mezi lety 2014 a 2015 vykazuje určitou stagnaci. V roce 2015 zemřelo na zhoubný nádor v České republice celkem 26 852 osob [1]. Na celém světě každoročně zemře na nádorová onemocnění téměř 7 milionů lidí, přičemž tento počet stále narůstá [2]. Nejčastější typy nádorového onemocnění v ČR k roku 2015 jsou rakovina prostaty u mužů a rakovina prsu u žen, dále pak rakovina plic a tlustého střeva [1].

Nárůst počtu lidí postižených tímto onemocněním můžeme dávat do souvislosti se stárnutím populace. Právě pokročilý věk pacienta je nejvyšší riziko vzniku rakoviny. Dalšími významnými faktory podílejícími se na vzniku rakovinotvorného onemocnění mohou být: genetické predispozice, špatná životospráva či vyšší výskyt chemických karcinogenů a fyzikálních faktorů v životním prostředí způsobujících nádorová onemocnění [1, 3].

1.2 Vznik a vývoj nádorového onemocnění

Hlavním principem vzniku nádorů je hromadění mutací, které vedou k poškození DNA a následným změnám v buněčné expresi [4]. Molekulární mechanismy regulující růst, diferenciaci a smrt buněk vlivem těchto mutací selhávají. To má za následek nekontrolovatelné buněčné dělení se schopností napadat ostatní tkáň a metastázovat do tkání vzdálených [5]. Genetické změny, které ovlivňují vznik a vývoj nádorového onemocnění, postihují především dvě hlavní skupiny genů, protoonkogeny a tumor-supresorové geny [4, 5].

Protoonkogeny kódují proteiny stimulující normální buněčný růst a dělení. Pokud nastane v jejich sekvenci bodová mutace, začnou produkovat proteiny, které mohou být aktivnější, nebo odolnější vůči degradaci než normálně exprimované proteiny. Takto mutovaný gen se nazývá onkogen. Další skupinou genů regulujících

buněčný cyklus jsou tumor-supresorové geny, které kódují proteiny inhibující buněčné dělení. Tyto proteiny pomáhají předcházet nekontrolovatelnému buněčnému růstu mnoha způsoby jako například opravovat poškozenou DNA, řídit vzájemnou adhezi buněk k mezibuněčné hmotě, nebo mohou být součástí signálních drah. Vzniknou-li na těchto genech bodové mutace, mohou exprimovat vadné proteiny jako v případě onkogenů. Obecně je potřeba více než jedna mutace, aby vyvolala změny charakteristické pro plně nádorovou buňku [4, 5].

Neobvyklé chování rakovinných buněk může mít osudné následky, jestliže k němu dochází v těle. Problém začíná tehdy, když projde jedna buňka někde ve tkáni maligní transformací – pochodem přeměny běžné buňky na buňku rakovinnou. Transformovaná buňka je obvykle imunitní soustavou těla rozpoznána jako „vzbouřenec“ a zničena. Pokud ovšem buňka zničení unikne, může se množit a dát základ nádoru – nahromadění nenormálních buněk uvnitř zdravé tkáně. Jestliže zůstávají nenormální buňky pouze na svém původním místě, je nádor označován za nezhoubný (benigní). Většina těchto nádorů nezpůsobuje vážné potíže a může být odstraněn chirurgickým zákrokem. Naproti tomu nádor zhoubný (maligní) se stává natolik útočným, že narušuje funkci jednoho nebo několika orgánů. Maligní nádory jsou nenormální v mnoha ohledech, krom nadměrného růstu. Mohou obsahovat neobvyklé počty chromozomů, mohou mít narušený metabolismus a přestávat pracovat jakýmkoliv přínosným způsobem [4-6].

1.3 Obecné principy protinádorové léčby

Léčba nádorových onemocnění je velice nákladná, složitá a klade si vysoké nároky jak na pacienta, tak i na ošetřující personál. Komplikovanost léčby vyplývá z toho, že nádorové onemocnění je různorodá skupina nemocí s odlišným biologickým chováním a nejednotnou patogenezi. Každý pacient musí mít svou individuální léčbu, která je podmíněná zejména typem a stádiem nádoru a zdravotním stavem pacienta [7, 8].

Léčbu nádorového onemocnění můžeme rozdělit podle několika hledisek:

- a) dělení léčby dle jejího cíle,
- b) dělení léčby dle léčebných modalit [8].

Mezi dělení dle cíle můžeme zařadit protinádorovou, podpůrnou a paliativní léčbu. Cílem protinádorové léčby je smrt nádorových buněk. Podpůrná léčba je zaměřena na mírnění obtíží vyvolaných přímo nádorem a zároveň se projevuje snahou o mírnění psychosociálních a duševních obtíží. Paliativní léčba se využívá v případě, že nádor nelze žádnými technikami odstranit. Snaží se jen o maximální prodloužení a zlepšení kvality života pacienta [7-9].

Protinádorová léčba, jak již bylo uvedeno, využívá léčebných modalit. Mezi tyto způsoby protinádorové léčby patří: chirurgická léčba, radioterapie a farmakoterapie. V počátcích zkoumání je i genová terapie [8, 10].

Chirurgické odstranění nádoru je nejčastější a někdy i jediná možnost boje proti zhoubnému nádoru. Pokud se ale rakovinné buňky dostanou do krevního řečiště, nebo mízního oběhu, rozšíří se tak do celého organismu. V tomto případě prosté chirurgické odstranění nestačí a musíme přistoupit k jinému druhu léčení [4]. Chirurgickou protinádorovou léčbu lze rozdělit do dvou základních výkonů: kurativní a paliativní operace. Kurativní operace si dává za cíl úplné odstranění nádorových buněk. V mnoha případech je ovšem nemožné zlikvidovat veškeré nádorové buňky. Cílem paliativní operace je celkové snížení masy nádorových buněk a usnadnění dalších léčebných metod [7-9].

Radioterapie v posledních šedesáti letech prodělala významné pokroky. Léčba ionizujícím zářením je dnes jedna ze základních technik při léčbě nádorového onemocnění. V současnosti podstupuje radioterapii přibližně 80 % pacientů se zhoubným nádorem [8]. V radioterapii se využívá elektromagnetické (*rentgenové, γ záření*), nebo korpuskulární (*α, β záření, neutrony, protony nebo π mezony*) záření. Metody radioterapie můžeme rozdělit na tři hlavní skupiny: teleradioterapii, brachyradioterapii a systémovou aplikaci radioizotopů [8].

Teleradioterapie je nejpoužívanější metodou radioterapie. Jedná se o zevní ozařování z dálky. Naproti tomu brachyradioterapie využívá zdroj záření přímo v oblasti nádoru. Systémová léčba radioizotopů je založena na podání radionuklidu ve formě rozpustné soli, která se chová neradioaktivně. Této léčby se používá zejména u nádoru štítné žlázy, kde je využíván radioaktivní izotop ^{131}I [7, 8].

Ozařování s sebou přináší řadu nežádoucích účinků, neboť mimo ozařování nádorových buněk dochází k ozáření i buněk zdravých. Mezi vedlejší účinky

radioterapie můžeme zařadit únavu, snížení chuti k jídlu, letargii, bolest hlavy, nevolnost, zvracení průjmy aj. Jako závažnější vedlejší účinky lze uvést poruchu krvetvorby, poškození sliznic a některých orgánů jako například poškození plic, srdce a jater [8].

Protinádorová farmakologická léčba je velice obecný pojem. Do této skupiny zařazujeme protinádorovou chemoterapii, protinádorovou hormonální léčbu a bioterapii [8].

Princip chemoterapie (*těž internistická léčba*) spočívá v podávání látek s jasně definovanou chemickou strukturou přirozeného nebo syntetického původu [8]. Chemoterapií se zabývá kapitola 1.4.

Protinádorovou hormonální léčbou lze ovlivnit růst tzv. „hormon-senzitivních“ či „hormon-dependentních“ nádorů. Největší závislost na hormonech je vidět v případě karcinomu prostaty či prsu. Cílem této léčby je zamezit proliferaci hormon-senzitivních nádorových buněk potlačením fyziologické produkce konkrétních hormonů nebo zablokováním navázání konkrétních hormonů na buněčné receptory [7, 8].

Bioterapie je léčebná metoda založena na použití látek, které jsou organismu vlastní. Oproti fyziologickému stavu se bioterapie liší v několikanásobném překročení fyziologických hodnot dané látky. Cílem těchto látek je omezit růst nádorových buněk, stimulace krvetvorby, posílení imunity a přímá destrukce nádorových buněk pomocí monoklonálních protilátek. Mezi farmaka používané v bioterapii patří hematopoetické růstové faktory (*podpora krvetvorby*), imunomodulační cytokiny (*podpora imunitní odpovědi na nádorovou buňku*) a monoklonální protilátky (*přímá destrukce nádorové buňky*) [7, 8].

1.4 Chemoterapie

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, chemoterapie je léčebná metoda založená na podávání různých látek s přesně definovanou chemickou strukturou. Tyto látky mohou být přírodního nebo syntetického původu. Obecně se chemoterapie užívá u bakteriálních, plísňových, virových, parazitárních a onkologických onemocnění. V této kapitole se budeme zabývat pouze protinádorovou chemoterapií [7, 8].

V onkologii podáváme léky s protinádorovým účinkem, tzv. cytostatika, jejichž principem je inhibice buněčného cyklu tím, že ničí zejména genetickou informaci. Cytostatika ovlivňují jak nádorové, tak i zdravé buňky. Rozdíl rychlosti dělení zdravých a nádorových buněk je jedním z nejdůležitějších vlivů, který určuje, jaká buňka bude daným cytostatikem více ovlivněna. Svou roli také hrají koncentrace cytostatika a typ nádoru. Velkým problémem cytostatik je jejich individuální metabolismus. Ten má za následek, že určitá dávka cytostatika může vyvolat u dvou různých pacientů postižených stejným typem zhoubného nádoru různou reakci [8, 10, 11]. Nový vývoj chemoterapeutik se snaží snížit vedlejší vlivy na minimum pomocí tzv. cíleného transportu léčiv. Toho se dosahuje například pomocí nanotransportérů (viz kapitola 1.5, str. 20) [12].

Mezi cytostatika řadíme alkylační cytostatika (př. *chlorambucil*), antimetabolity (př. *methotrexát*), protinádorová antibiotika (př. *doxorubicin*), rostlinné alkaloidy (př. *ellipticin*), platinová cytostatika (př. *cisplatina*) aj [8]. V následujících podkapitolách jsou popsána dvě konkrétní cytostatika, která jsou předmětem této studie: doxorubicin a ellipticin.

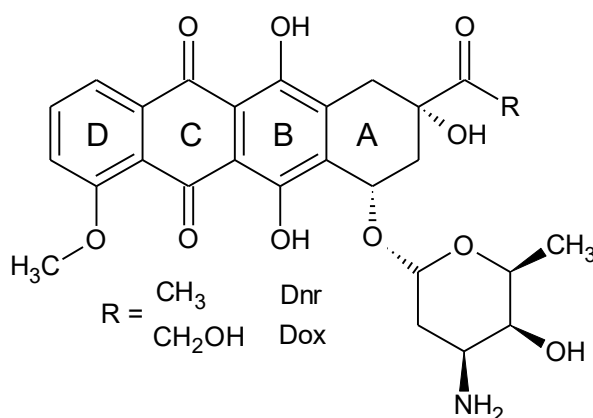
1.4.1 Doxorubicin

Doxorubicin (dále *Dox*), nazýván také adriamycin, systematickým názvem (8S,10S)-10-(4-amino-5-hydroxy-6-ethyl-tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-6,8,11-trihydroxy-8-(2-hydroxyacetyl)-1-methoxy-7,8,9,10-tetrahydrotetracen-5,12-dion, je antracyklinové antibiotikum [13].

Antracykliny byly poprvé izolovány z bakterie *Streptomyces peucetius* na počátku 60. let 20. století. Prvním izolovaným antracyklinem byl daunorubicin, který byl úspěšně použit k léčbě leukémie. Později se však ukázalo, že daunorubicin způsobuje poškození srdce. Vědci proto genetickými modifikacemi *Streptomyces peucetius* připravili nový typ antracyklinu – doxorubicin. Dox je sice účinnější než daunorubicin, nicméně jeho kardiotoxicita je stále vysoká. Dnes existuje více než 2 000 derivátů Dox [13-15].

Všechna antracyklinová antibiotika mají rigidní planární strukturu a obsahují dvě části: cukernou složku a aglykon. Aglykon se skládá z tetracyklického kruhu, ve kterém je obsažena chinonová a hydrochinonová skupina. Cukerný zbytek nazývaný

daunosamin je ke zbytku molekuly připojen glykosidickou vazbou. Chemická struktura daunorubicinu a doxorubicinu je zobrazena na obr. 1.1 [14, 15].



Obr. 1.1 – Struktura vybraných antracyklinových léčiv:
doxorubicin (Dox), daunorubicin (Dnr). Převzato z [14].

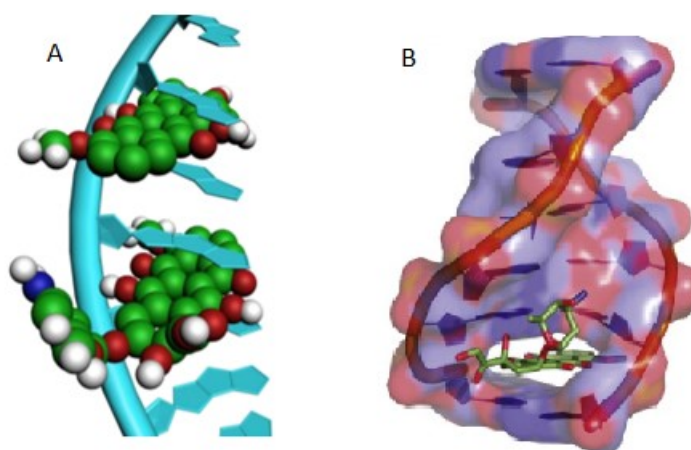
Dox je jedno z nejvíce používaných chemoterapeutik v klinické praxi nejen proti tumorům, ale i proti krevním chorobám. Používá se především k léčbě akutních lymfatických leukémií, rakoviny prsu, žaludku, plic aj. [8, 15]. Mezi jeho vedlejší účinky patří kardiotoxicita a běžné vedlejší účinky cytostatik (*nevolnost, zvracení, aj.*) [8].

Ačkoliv Dox patří k nejvíce používaným cytostatikům, stále není jeho mechanismus úplně objasněn. Podle posledních studií se zdá, že Dox působí hned několika možnými mechanismy:

- a) interkalace do DNA a následná inhibice proteosyntézy,
- b) poškození DNA v důsledku inhibice topoizomerasy II α (*hlavní mechanismus*)
- c) tvorba kovalentních aduktů s DNA,
- d) tvorba volných radikálů vedoucí k poškození DNA a biomembrán [15-18].

a) Interkalace do DNA a následná inhibice proteosyntézy:

Díky planární struktuře antrachinonového cyklu antracyklinů (*podobné jako u dusíkatých bází*) je primární cílová molekula DNA. Dox interkaluje mezi jednotlivé páry bází a pomocí kruhu C (*viz obr. 1.1, str. 13*), který slouží molekule jako kotva, stabilizuje komplex Dox-DNA pomocí vodíkových vazeb. Cukerný zbytek se nachází v malém žlábkku DNA a interkaluje s okolními bázemi v blízkosti antrachinonového cyklu. Na obr. 1.2 je zobrazena ukázka doxorubicinu interagujícího s jednovláknovou DNA (*ssDNA*) a interkalujícího s dvouvláknovou DNA (*dsDNA*) [16-18].



Obr. 1.2 – Model interkalace Dox do ssDNA (A) a model interkalace Dox do dsDNA (B): molekula Dox znázorněna zeleně. Převzato z [16, 18].

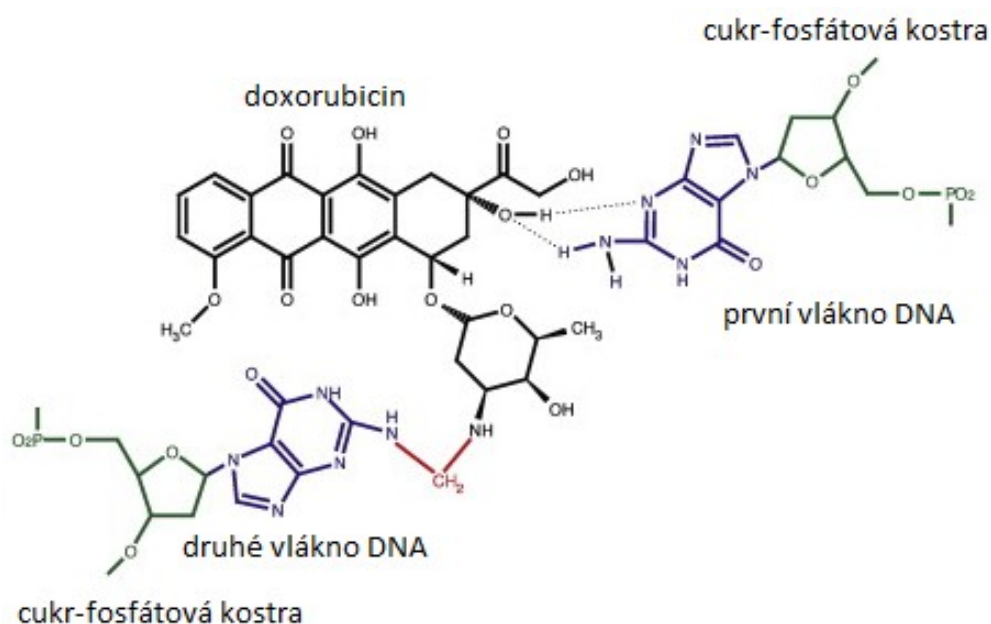
b) Poškození DNA v důsledku inhibice topoizomerasy II α :

Topoizomerasy jsou nukleární enzymy potřebné pro správnou funkci replikace, transkripce a chromozomálních oprav. Existují dva druhy topoizomerasy – topoizomerasa I a II. Topoizomerasa I se váže na jeden ze dvou řetězců DNA, uvolňuje tak torzní napětí mezi vlákny, rozpojí jedno z vláken DNA a umožní tak replikačním enzymům replikaci či transkripci. Po replikaci opět vlákna spojí bez spotřeby energie. Na druhou stranu topoizomerasa II se váže na obě vlákna DNA, která rozpojí a opět spojí za spotřeby energie. Topoizomerasy jsou tedy klíčové enzymy zejména při replikaci. Pokud by byly tyto enzymy inhibovány některými cytostatiky, vzniklé zlomy v DNA by se nikdy nemohly vrátit do původního stavu dvoušroubovice a buňka by tak musela spustit programovanou smrt (*apoptosu*) [4, 10, 11].

Dox se váže na konkrétní izoformu topoizomerasy II α a stabilizuje komplex DNA-topoizomerasa II α , čímž brání opětovnému rozpojení vláken DNA s enzymem. Replikace se zastaví a vzniklý zlom v DNA nutí buňku spustit apoptosu [13, 15, 18].

c) Tvorba kovalentních aduktů s DNA:

Dalším možným, i když ne tak častým, mechanismem působení Dox je tvorba aduktů s DNA za pomoci formaldehydu. Dox tvoří kovalentní vazbu pomocí methylenového můstku (*pocházejícího z formaldehydu*) mezi aminoskupinou cukerného zbytku daunosaminu a aminoskupinou guaninu jednoho z vláken DNA. Antrachinonový cyklus doxorubicinu interaguje s druhým vláknem DNA pomocí vodíkových vazeb, čímž je zaručena relativně vysoká stabilita aduktu [14, 18]. Díky nízkým používaným koncentracím léčiva v klinické praxi tento mechanismus probíhá minoritně a za hlavní mechanismus působení lze označit inhibici topoizomerasy II α [16]. Na obr. 1.3 je zobrazena struktura aduktu doxorubicinu s DNA.



Obr. 1.3 – Struktura aduktu Dox s DNA: Dox (černě) interaguje s prvním vláknem DNA pomocí vodíkových můstků, s druhým vláknem interaguje molekula Dox přes methylenový můstek (červeně) pocházející z formaldehydu. Převzato z [16].

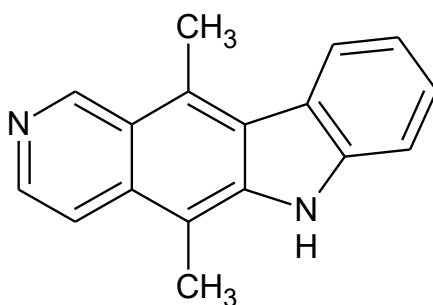
d) Tvorba volných radikálů vedoucí k poškození DNA a biomembrán:

Posledním z uvedených mechanismů Dox je vznik reaktivních forem kyslíku (*dále ROS*) díky možné redukci chinonového kruhu. Redukcí chinonového kruhu vzniká velmi reaktivní semichinonová forma, která velmi rychle a ochotně předává svůj volný elektron na molekulu kyslíku. Tímto způsobem vznikají ROS ve formě superoxidových aniont-radikálů $O_2^{\bullet -}$ nebo peroxidových aniontů O_2^{2-} , jenž dávají vzniknout peroxidu vodíku. Tyto ROS mohou být přeměněny pomocí dalších redoxních systémů (*nejčastěji přes systémy obsahující ionty železa*) na hydroxylový radikál OH^{\bullet} , který je vysoce reaktivní a „ničí“ prakticky vše, co s čím přijde do styku [13, 16].

Největším problémem vedlejších účinků doxorubicinu je jeho vysoká kardiotoxicita, jejíž mechanismus není zcela objasněn. Kardiotoxicita je nejpravděpodobněji způsobená oxidačním stresem. V současné době se řada laboratoří snaží tento vedlejší účinek co nejvíce potlačit různými strategiemi. Jednou z možných strategií je zvýšení antioxidační ochrany kardiomyocytů proti ROS. Jinou možnou strategií je enkapsulace cytostatika do nanočástice a uvolnění léčiva přímo v okolí nádorových buněk [16-19].

1.4.2 Ellipticin

Ellipticin (*dále Elli*), systematicky 5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]karbazol, je alkaloid vyskytující se v rostlinách čeledi toješťovitých (*Apocynaceae*). Poprvé byla tato sloučenina izolována roku 1959 ze stromu *Ochrosia elliptica*. Chemická struktura Elli je znázorněna na obr. 1.4 [6].



Obr. 1.4 – Chemická struktura ellipticinu:
převzato z [6].

Elli vykazuje cytostatické účinky. Působí proti řadě nádorových onemocnění, jako jsou například leukémie, rakovina plic, střev, jater či prsu [17, 20]. Naneštěstí díky jeho vysoce hydrofobnímu charakteru a jeho vedlejším účinkům je terapeutické použití tohoto cytostatika omezené [20, 21].

Mezi nejčastější vedlejší účinky ellipticinu se řadí sucho v ústech, mykóza jazyku a jícnu, zažívací obtíže, hypertenze, svalová křeč, chronická únava a selhání ledvin [17, 20-22].

Elli a jeho metabolity mají hned několik mechanismů působení, které se mohou navzájem překrývat a tím zesilovat cytotoxický účinek léčiva. Jedná se o mechanismy zastavující buněčný cyklus:

- a) interkalace do DNA,
- b) inhibice topoizomerasy II,
- c) tvorba kovalentních aduktů s DNA po enzymové aktivaci pomocí cytochromů P450 nebo peroxidasy [20-22].

Elli také inhibuje spojení mezi transportem elektronů a fosforylací, díky tomu naruší syntézu ATP a tím poruší energetickou rovnováhu buňky [20-22].

a) Interkalace do DNA:

Chemická struktura Elli je podobná komplementární struktuře purin – pyrimidinové bázi. Nepolární charakter Elli navíc napomáhá k interkalaci s hydrofobními částmi DNA, čímž se efekt znásobí. Díky vmezeření Elli se dvoušroubovice DNA naruší a rozvolní, což má za následek zastavení buněčného cyklu, resp. replikace či transkripce [17, 21, 22].

b) Inhibice topoizomerasy II:

Jeden z hlavních mechanismů působení Elli je inhibice topoizomerasy II. Elli, stejně jako Dox, interaguje s nukleárním enzymem za tvorby ternárního komplexu. Tento komplex topoizomerasa II-Elli-DNA nutí vlákno DNA rozvolnit se, čímž zabrání replikaci i transkripci. Pokud má buňka poškozenou genetickou informaci a nemůže se tak dále dělit, je nucena spustit apoptosu [6, 20-22].

Mnoho studií tvorbu ternárního komplexu potvrdila, nicméně stále není vyřešena krystalová struktura tohoto komplexu [20].

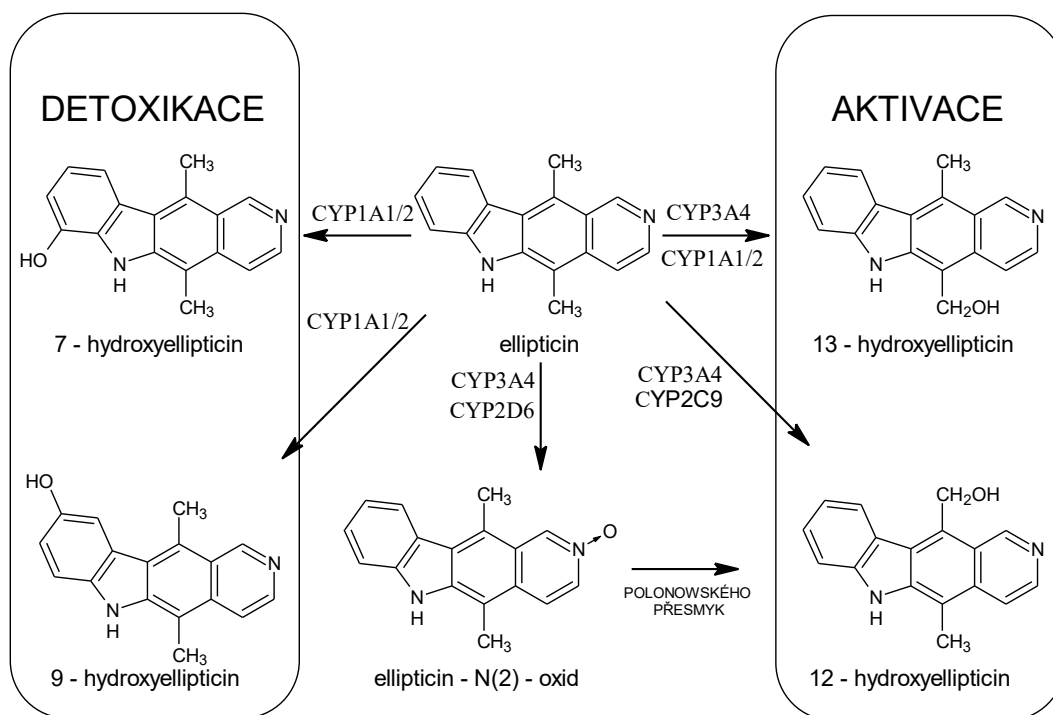
c) Tvorba kovalentních aduktů s DNA po enzymové aktivaci pomocí cytochromů P450 nebo peroxidas:

Tvorba kovalentních aduktů Elli s DNA po enzymové aktivaci cytochromy P450 či peroxidasami je mechanismus působící na konkrétní buňky s určitou enzymovou výbavou [17, 20-22].

▪ ***Biotransformace Elli katalyzovaná cytochromy P450:***

Cytochromy P450 (*dále jen CYP*) jsou klíčové hemoproteiny metabolismu xenobiotik. Substráty těchto enzymů jsou biotransformovány na polárnější látky, pomocí oxidačních, peroxidačních či redukčních změn, čímž se zvyšuje jejich možnost vyloučení z organismu. Daný substrát může být aktivován, a to v „pozitivním“ i v „negativním“ smyslu slova. Při „negativní“ aktivaci se látka může stát mutagenní, karcinogenní či sloučeninou více toxičtější než původní substrát. Některé druhy léčiv se po biotransformaci mohou stát biologicky aktivnější. V tomto případě mluvíme o tzv. „pozitivní“ aktivaci [23, 24].

Elli je pomocí CYP přeměněn na pět různých derivátů, přičemž jsou dva z těchto metabolitů (7-hydroxy- a 9-hydroxyellipticin) detoxikační a mohou být vyloučeny z organismu, přičemž 9-hydroxyellipticin je stále farmakologicky aktivní látka. Další dva deriváty (12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticin) jsou reaktivní sloučeniny, které tvoří s DNA dva adukty pomocí kovalentní vazby na bázi deoxyguanosinu (*viz obr. 1.6, str. 20*). Ellipticin-N(2)-oxid je přeměněn Polonowského přesmykem na aktivní derivát 12-hydroxyellipticin. Biotransformace ellipticinu pomocí CYP je schematicky zobrazena na obr. 1.5 (*str. 19*) [21, 22].

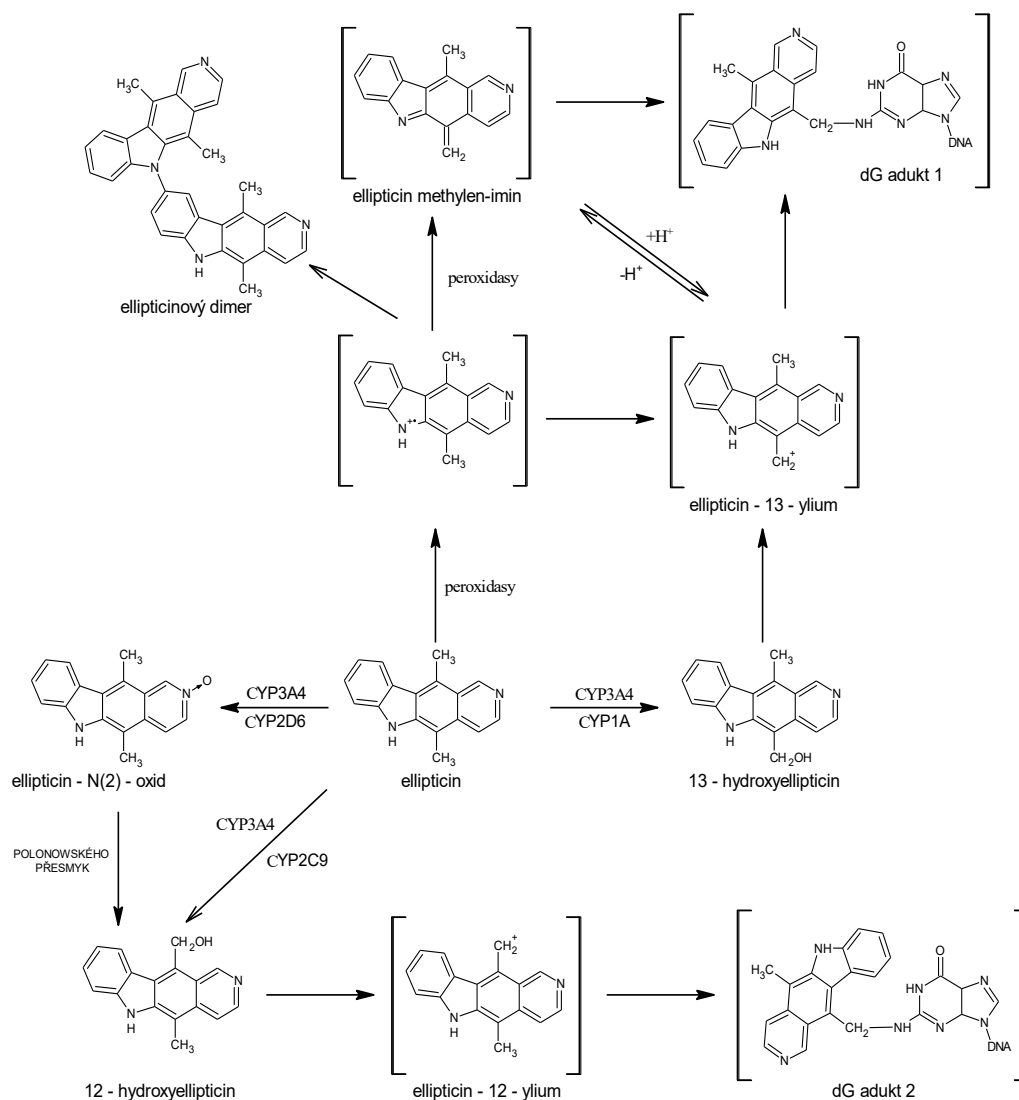


Obr. 1.5 – Biotransformace Elli lidskými cytochromy P450 (CYP): Elli je oxidován pomocí CYP na pět různých metabolitů, z nichž jsou dva aktivovány a mohou tvořit s DNA dva adukty pomocí báze deoxyguanosinu, převzato z [21].

▪ **Biotransformace Elli katalyzovaná peroxidasami:**

Peroxidasy jsou enzymy ze skupiny oxidoreduktas, které pomocí peroxidu vodíku oxidují různé substráty [4]. Jako typické zástupce peroxidas oxidujících Elli lze uvést lidskou myeloperoxidasu, ovčí a lidskou cyklooxygenasu nebo křenovou peroxidasu. Některé z uvedených peroxidas jsou exprimovány v různých typech nádorů [21, 22].

Elli je peroxidasami oxidován pomocí jednoho elektronu na volný radikál, který buď tvoří s DNA adukt, nebo tvoří další metabolity. Při experimentech *in vitro* byly detekovány dva konkrétní metabolity Elli (*viz obr. 1.6, str. 20*): dimer Elli a N(2)-oxid ellipticinu, přičemž N(2)-oxid ellipticinu je také metabolit CYP. Při řešení struktury aduktů DNA s deriváty Elli se nezávisle na sobě podařilo prokázat dvěma různými metodami (*Elli značeného tritiem a „³²P – postlabelingu“*), že ačkoliv biotransformace ellipticinu CYP a peroxidasami probíhá odlišným mechanismem, je v obou případech struktura aduktů stejná. [21, 22].



Obr. 1.6 - Biotransformace Elli: metabolismus Elli je katalyzován CYP nebo peroxidasami. V obou případech vznikají stejné adukty s deoxyguanosinem (dG) v DNA. Převzato a upraveno z [21].

1.5 Využití nanotechnologie v protinádorové léčbě

Od počátku 21. století se nanotechnologie začleňuje do různých odvětví od průmyslu po medicínu. Během posledních let se tento obor neuvěřitelně rychle rozrůstá [25].

Jedním z hlavních oborů, kde se nanotechnologie postupně integruje, je medicína, resp. nanomedicína. Nanočástice se začínají pomalu využívat v chirurgické onkologii ve formě kvantových teček či koloidního zlata k označení a vymezení nádoru, případně v radiční onkologii ke zlepšení zobrazovacích technik. Dokonce i v chemoterapii se začínají používat takové nanočástice, které mohou

transportovat konkrétní cytostatikum do cílové nádorové tkáně. V tomto případě lze mluvit o tzv. nanotransportérech [26-28].

I přes rychlý vývoj nových cytostatik, není účinnost léčby řady karcinomů, například rakoviny plic, efektivní. Léčivo se dostane k cílovému místu často v nízkých koncentracích, které již nemají žádoucí účinek. Cestou k určeným buňkám může cytostatikum působit nespecificky na okolní tkáň a tím vyvolat řadu vedlejších účinků. Enkapsulací léčiva do nanotransportéru se mohou tyto problémy „obejít“. Léčivo může být uvolněno přímo v cílové tkáni, čímž se zvýší samotná účinnost léčby a zároveň se sníží vedlejší účinky cytostatika [29, 30].

Studium a vývoj cytostatik enkapsulovaných v nanotransportérech jsou podmíněny hned několika aspekty:

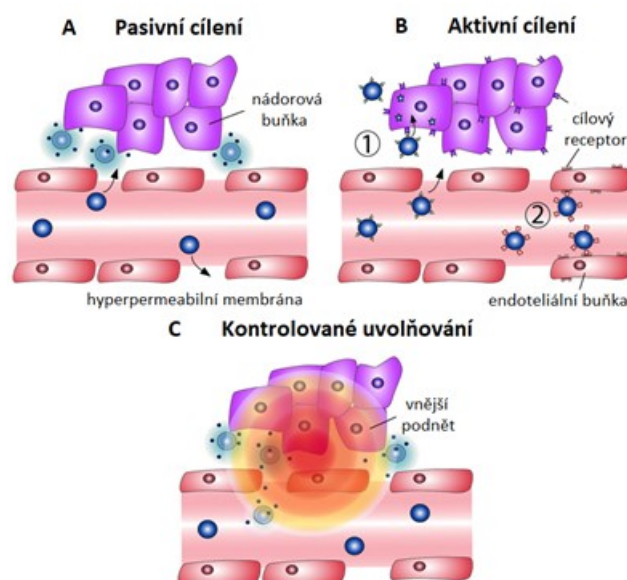
- zvýšení rozpustnosti a stability léčiv enkapsulací do hydrofilního nanotransportéru,
- ochrana léčiv před biodegradací a exkrecí terapeutika a zároveň prodloužení cirkulace léčiva v oběhové soustavě,
- maximalizace léčiva v nádorové tkáni a ochrana tkáně zdravé,
- kontrolované uvolňování léčiv a omezení vzniku rezistence [30-32].

Mezi přednosti nanotransportérů patří malý rozměr či vysoký poměr povrchu ku objemu. Mohou modulovat farmakokinetické i farmakodynamické vlastnosti léčiv, čímž zvyšují terapeutický index léčiva. Na druhou stranu využití nanomateriálů v onkologické léčbě mohou bránit právě jejich fyzikálně – chemické vlastnosti. Je známo, že tyto vlastnosti jsou podmíněny prostorovou strukturou nanočástic. I malá změna ve struktuře nanotransportéru může mít za následek razantní změnu jeho fyzikálně – chemických vlastností, které mohou v organismu způsobovat řadu komplikací. Dalším cílem nanomedicíny je studium exkrece nanotransportérů z organismu [29-32].

Pochopením těchto posledních dvou aspektů napomůže reprodukovatelnosti léčby a většímu vzestupu nanotransportérů v klinické praxi [29].

1.5.1 Obecné strategie nanomedicíny

Nanomedicína se obecně snaží zlepšit terapeutický index léčiva třemi metodami: pasivním a aktivním cílením léčiva nebo kontrolovaným uvolňováním léčiva v oblasti nádorové tkáně [30]. Tyto metody jsou graficky znázorněny na obr. 1.7.



Obr. 1.7. – Schématické znázornění strategií pro zvýšení terapeutického indexu léčiva: extravazace nanotransportéru s léčivem do nádorové buňky pomocí hyperpermeabilní membrány vede k pasivnímu cílení léčiva v nádorové tkáni (A); aktivní zacílení rakovinných buněk (1) nebo nádorového endotelia (2) pomocí nanotransportérů modifikovaných na povrchu ligandem (B); nanotransportéry uvolňující léčivo v blízkosti nádorové tkáně po vystavení vnitřního či vnějšího podnětu (C). Převzato z [30].

Základním principem pasivního cílení léčiva je zvýšená propustnost nádorových kapilár a nedostatečně rozvinutý lymfatický systém. Tyto dva efekty přispívají k tzv. „efektu zvýšené permeability a retence“ (*dále EPR*). Nanotransportér s léčivem se může díky větší propustnosti cév dostat do nádorové tkáně snadněji, navíc díky nedokonalosti lymfatického systému nemůže být efektivně odstraněn a dochází k jeho akumulaci. Díky EPR dochází k akumulaci léčiva a zároveň dochází taktéž ke zvýšení účinné koncentrace cytostatika v nádorové tkáni [29-32].

Aktivní cílení léčiva využívá zcela jiného principu, a to modifikací povrchu nanočástice ligandem. Tyto ligandy vykazují vysokou afinitu vůči molekulám, které jsou produkovány zejména v cílových buňkách. Navázáním ligandu na molekulu či buněčný receptor se uvolní léčivo z nanotranspotéru. Jak již bylo výše uvedeno,

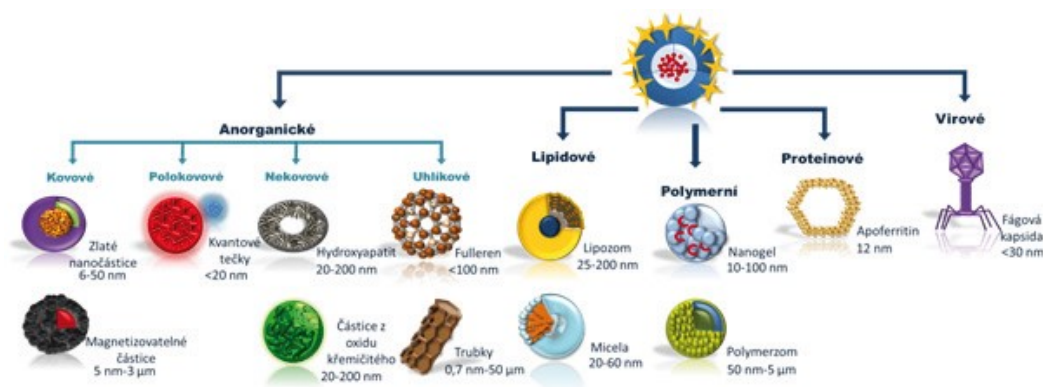
nanočástice mají velký poměr povrchu ku objemu. Tato skutečnost se využívá ke zvýšení účinnosti modifikací povrchu nanočástice několika druhy ligandů najednou. Jako ligandy pro aktivní cílení léčiv lze použít například protilátky, argynylglycylaspartátové kyseliny (tzv. *RGD peptidy*), foláty, transferiny či aptamery [29-32].

Poslední strategií je kontrolované uvolňování léčiva. Nanočástice putují v organismu a „čekají“ na podnět, který uvolní léčivo. Daný stimul může být vnitřního či vnějšího typu. Mezi vnitřní podněty můžeme zahrnout změny pH, redoxního potenciálu buňky či změny iontové síly v nádorových tkání. Např. nádorové buňky anaerobně spalují velké množství glukosy, čímž okyselují jejich extracelulární prostor. Tato změna pH může být využita jako „spouštěcí“ stimul pro nanotransportér. Mezi vnější stimul lze zařadit působení tepla, světla, ultrazvuku, magnetického či elektrického pole. [29-33].

1.5.2 Potencionálně využitelné nanočástice v klinické praxi

Jen málo nanomateriálů je již v klinické praxi zavedeno. Jedním z takových léčiv, které již bylo schváleno Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (*dále FDA*), je Doxil® - liposomální doxorubicin pokryt vrstvou polyethylenglykolu. Existuje celá řada typů nanotransportérů, které mají velký potenciál v klinické praxi uspět a jsou v různých laboratořích po celém světě studovány [30-34].

Nanotransportéry můžeme rozdělit dle anorganického či organického původu [35]. Tyto kategorie se dále různí, jak je uvedeno na obr. 1.8.

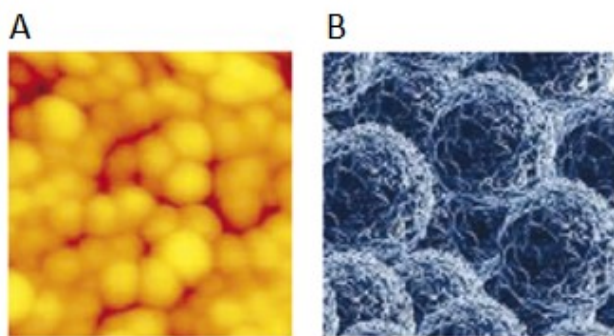


Obr. 1.8 – Typy nanočástic: anorganické – kovové, polovodičové, nekovové a uhlíkové; organické – lipidové, proteiny/virové a polymerní. Uvedeny příklady a průměrné velikosti nanočástic. Převzato [35].

A. Anorganické nanočástice

▪ Kovové nanočástice

V dnešní době jsou nanomolekuly kovů intenzivně studovány. Obecně jsou pro nanomedicínské aplikace využívány nanočástice kovů o velikosti 10 – 500 nm, což je vhodné pro jejich internalizaci prostřednictvím EPR. Další výhodou těchto částic je zvýšení afinity, stability či biokompatibility pomocí modifikace jejich povrchu. Naneštěstí většina kovů je pro organismus genotoxická, což znemožňuje aplikaci v klinické praxi. Nejpokrokovějšími kovovými nanočásticemi jsou zlaté a magnetické nanočástice, jež jsou zobrazeny na obr. 1.9. Slibné jsou také nanočástice ruthenia [29].



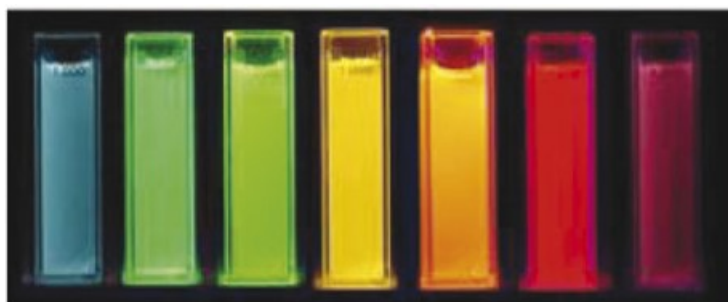
Obr. 1.9 - Kovové nanočástice: zlaté nanočástice (A), magnetické nanočástice (B). Převzato a upraveno z [38].

Zlaté nanočástice (<50 nm) mohou být připraveny s různými tvary („nanosféry“, „nanoskořápky“, „nanotyče“ nebo „nanoklece“). Tyto částice vykazují plazmonový rezonanční efekt, díky čemuž jsou výbornými značkami pro biosenzory, protože mohou být detekovány četnými technikami, jako jsou optická absorpce, fluorescence či elektrická vodivost [36,38].

Magnetické nanočástice jsou sférické nanokrystaly (10 – 20 nm) tvořeny magnetickými oxidy (Fe, Mg, Hf, aj.). Často jsou stabilizovány dextranem nebo polyethylenglykolem. Magnetické nanostruktury vykazují superparamagnetické vlastnosti. Pokud je tedy na tyto částice vkládáno vnější magnetické pole, částice se zmagnetizují a uspořádají se ve směru působení vnějšího magnetického pole. Tímto způsobem lze zacílit transport léčiv. Magnetické nanočástice jsou využívány především v diagnostických metodách pro zobrazování tumorů. Již existují některé nanočástice oxidu železa v klinickém testování [31, 37, 38].

▪ Polovodičové nanočástice

Výzkum koloidních fluorescenčních polovodičových nanokrystalů (*viz obr. 1.10*) neboli tzv. kvantových teček (*z angl. quantum dots*) se v posledních dvou desetiletích rozvinul od elektronických věd o materiálech až po biologické aplikace. Jádro těchto částic se skládá z kombinací kovů ze XII. – XIV. vedlejší skupiny (*CdSe, CdTe, CdS, ZnS, ZnSe*) nebo XIII. – XV. skupiny (*GaAs, GaN, InP, InAs*) potaženým tenkou vrstvičkou ZnS. Celkový rozměr kvantových teček je mezi 2 – 10 nm [39].



Obr. 1.10 - Kvantové tečky: Převzato a upraveno z [38].

Tyto nanokrystaly jsou fotostabilní. Vykazují velikost a složení emisních spekter a vysokého kvantového výtěžku. Jsou odolné vůči „fotovybělení“ a vykazují výjimečnou odolnost vůči světelné a chemické degradaci. Další výhodou kvantových teček je emise vždy intenzivního záření o stejné vlnové délce bez ohledu na vlnovou délku excitačního záření. Díky těmto výjimečným vlastnostem jsou kvantové tečky vynikající kontrastní látky pro zobrazovací techniky [39].

I přes jejich nesporné výhody, jsou kvantové tečky složeny z těžkých, toxických kovů, což zatím stále znemožňuje jejich aplikaci v klinické diagnostice [25].

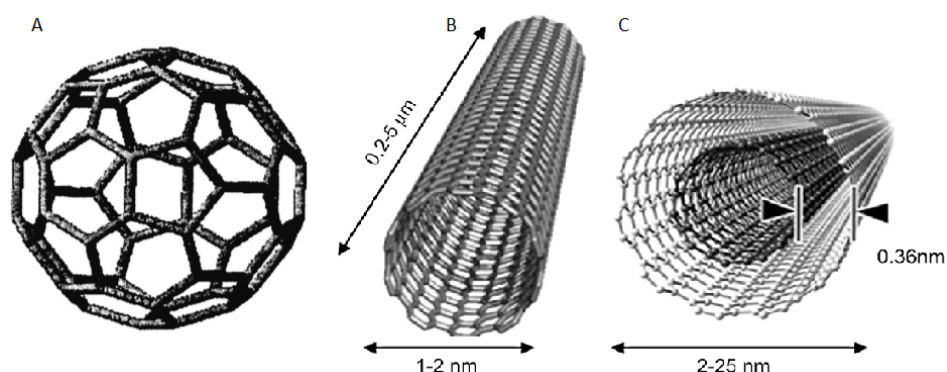
▪ Nekovové nanočástice

Mezi nekovové nanočástice patří například hydroxyapatit, který je hlavní složkou kostí. Kostra denně prodělává remodelaci kostí, tj. odstraňování či nahrazování kostních buněk – osteoblastů. Hydroxyapatit má biologickou kompatibilitu a je široce využíván v klinické praxi. Současný výzkum se zabývá novými přípravami hydroxyapatitu, jejichž cílem je lépe a účinněji využívat biomedicínské aplikace a vyrábět tento materiál s vlastnostmi bližšími k vlastnostem živých kostí. „Nanozrnitost“ a povrchová smáčivost jsou vlastnosti hydroxyapatitu, které nejen

podporují zvýšenou selektivní adsorpci vitronektinu (protein, který zprostředkovává adhezi osteoblastů), ale také ovlivňují konformace, které zlepšují funkce osteoblastů [40].

▪ Uhlíkové nanočástice

V klinické praxi lze využít i některé alotropické modifikace uhlíku – fullereny či uhlíkové nanotrubičky (*dále CNT*), které jsou zobrazeny na obr. 1.11 [41].



Obr. 1.11 - Uhlíkové nanočástice: fullerén (A), jednovrstvé – SWCNT (B) a vícevrstvé – MWCNT (C) nanotrubičky. Převzato a upraveno z [41, 42].

Fullereny jsou 60-ti uhlíkové sférické duté molekuly. CNT jsou v podstatě dlouhé, tubulární fullereny, které mají výtečné elektrické, mechanické a optické vlastnosti. Nevýhodou je jejich nerozpustnost ve vodě, která se dá modulovat chemickou změnou jejich povrchu [42-44].

CNT se dělí do dvou základních skupin dle počtu vrstev grafenu: jednovrstevné (*dále SWCNT*), složené z jedné vrstvy grafenu, a mnohovrstevné (*dále MWCNT*), složené z více vrstev grafenu. MWCNT se dělí na další typy podle uspořádání vrstev grafenu na model „matrjoška“, kde jsou grafenové vrstvy uspořádány do koncentrických rovin, a model „pergamen“, kde je celá CNT složena z jedné jediné vrstvy a stočena do ruličky [31, 42-44].

CNT se zkoumají z pohledu potencionálních transportérů léčiv, různých biomolekul a kontrastních látek pro magnetickou rezonanci [42-44].

B. Organické nanočástice

▪ Polymerní nanočástice

Všechny polymerní nanočástice sestávají z monomerních stále se opakujících jednotek, které tvoří celou škálu polymerních nanočástic. Mezi nejstudovanější nanočástice patří dendrimery a v posledním desetiletí i „nově“ polymersomy [31, 45, 46].

Dendrimery jsou vysoce rozvětvené, globulární makromolekuly sestávající z několika ramen vycházejících ze společného jádra. Na konci ramen jsou rozmístěné různé funkční skupiny, které lze využít k připojení léčiva. Taktéž lze léčivo uzavřít uvnitř dendrimeru. V posledních letech byl odhalen velký potenciál dendrimerů pro klinickou praxi od přenosu genů, přes zobrazovací techniky pomocí magnetické rezonance až po vývoj vakcín, antivirotik a antibakteriálních léků [31, 38, 45].

Polymersomy jsou umělé váčky vyrobené ze syntetických materiálů amfifilních blokových kopolymerů. Typické polymersomy jsou duté koule, které obsahují vodný roztok s enkapsulovaným léčivem chráněným dvouvrstvou membránou. Mezi výhody polymersomů patří „laditelné“ vlastnosti povrchu membrány a schopnost enkapsulovat téměř libovolné molekuly [46].

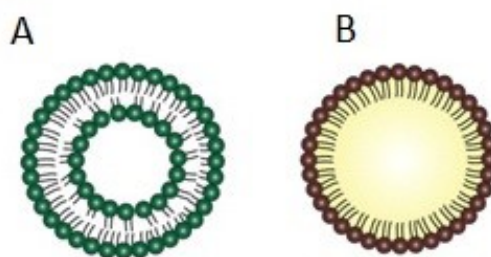
▪ Biodegradabilní nanočástice

Snaha obejít některé toxické vlastnosti anorganických nanočástic vedla vědce k vývoji takových nanotransportérů, které jsou tělu vlastní nevyvolávajících imunitní odpověď a jsou biodegradabilní. Mezi takové nanopřenašeče lze zařadit lipidové a proteinové nanočástice. Taktéž do této skupiny lze řadit takové polymerní nanočástice, které sestávají z přírodních polymerů (*např. kyselina hyaluronová, heparin, dextran aj.*) [29, 31].

▪ Lipidové nanočástice

Existuje celé spektrum lipidových nanočástic. Liposomy (*Doxil®* či *Caexyl®*) byly mezi prvními schválenými lipidovými nanotransportéry FDA, které jsou dodnes nejstudovanější formou nanočástic v protinádorové terapii. Dalším hojně

studovaným typem lipidových částic jsou micely [30]. Obě nanostruktury jsou zobrazeny na obr. 1.12.



Obr. 1.12 - Lipidové nanočástice: liposom (A) a micela (B). Převzato a upraveno z [30].

Liposomy jsou uzavřené fosfolipidové dvojvrstvy podobné biologickým membránám mající v průměru 50 – 100 nm. Díky amfifilnímu charakteru mohou ve svém vnitřku přenášet hydrofilní molekuly, anebo mohou přenášet hydrofobní molekuly rozpuštěné v membráně. Liposomy mají vynikající penetrační, difúzní a cirkulační vlastnosti. Tyto vlastnosti lze modulovat různou modifikací povrchu liposomu. Naneštěstí mají liposomy velmi nízkou transportní kapacitu [29, 38].

Micely jsou velmi podobné liposomům, jsou však tvořeny pouze jednou vrstvou fosfolipidů. Nicméně vykazují podobné vlastnosti jako liposomy [25, 30].

▪ **Proteinové nanočástice**

Nejvíce studované nanopřenašeče proteinové povahy jsou albumin a apoferritin, který je podrobněji rozebrán v kapitole 1.5.3 (*str.* 29). Speciálním typem proteinových nanočástic jsou částice virové [33].

Albuminové proteiny představují atraktivní strategii pro enkapsulaci léčiv. Výhodou albuminových nanočástic je jejich biodegradabilita, biokompatibilita, snadná výroba a vysoká kapacita pro enkapsulaci léčiva. Díky velkému množství nabitých skupin postranních řetězců aminokyselin lze kovalentně modifikovat povrch proteinu, a tím měnit dle potřeby fyzikálně – chemické vlastnosti [47].

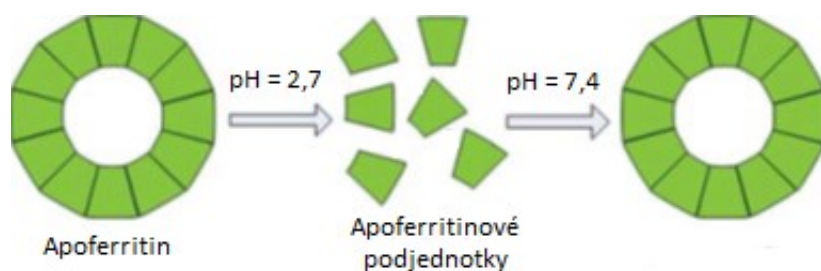
Virová částice je obvykle tvořena několika stovkami až tisíci proteiny, které se sestaví do správné struktury a tvoří dutou kostru pro nukleovou kyselinu. Jejich velikost se pohybuje od 10 nm až po 1 μ m. Do volného prostoru kapsidy lze krom nukleové kyseliny také enkapsulovat léčivo. Nejvíce se používá adenovirus či virus

chlorotické skvrnitosti vigny. Velkou výhodou virových nanotransportérů je snadná výroba tisíců uniformních proteinových částic a snadná modifikace jejich povrchu. Nevýhodou může být imunitní odpověď organismu i přesto, že je hostitelskou buňkou daného viru rostlinná buňka či bakterie [35].

1.5.3 Apoferritin

Apoferritin (*dále jen Apo*) je 480 kDa proteinová složka ferritinu. Je sestaven z 24 symetrických podjednotek, které tvoří kavitu s vnitřním a vnějším průměrem 7,5 a 13 nm. Apo má celkem 15 kanálů, které jsou tvořeny na křižovatkách těchto podjednotek o průměrech mezi 3 – 4 Å [48, 49].

Proteinová klec může v nízkém pH reverzibilně disociovat na své podjednotky. Za fyziologického pH jsou tyto podjednotky znovu rekonstituovány a tvoří tak opět biologicky aktivní protein [49, 50]. Reverzibilní disociace Apo je zachycena na obr. 1.13.



Obr. 1.13 – Reverzibilní disociace apoferritinu (*Apo*): Apo disociuje v nízkém pH na své proteinové podjednotky, které se mohou při fyziologickém pH opětovně „sbalit“ a vytvořit tak znovu biologicky aktivní protein. Převzato a upraveno z [49].

Skutečností, že Apo reverzibilně disociuje, lze využít v cílené protinádorové terapii. Do kavity proteinu lze enkapsulovat cytostatikum, které by se uvolnilo v blízkosti maligních buněk. Nádorové buňky potřebují velké množství energie. Tu získávají z neustálého přísunu glukosy, kterou odbourávají anaerobně. Tomuto jevu se říká tzv. „Warburgův efekt“. Bez mitochondrií nemohou efektivně metabolizovat glukosu a navíc nemohou regenerovat koenzymy. K oxidaci koenzymů využívají přeměnu pyruvátu na laktát, který je z velké části posílán do jater a tam znovu přeměněn na glukosu. Nicméně určitá část laktátu se nachází v extracelulárním prostoru buňky, čímž sníží pH prostředí přibližně na hodnotu 6,7. Díky slabě

kyselejšímu prostředí může Apo disociovat v blízkosti nádorových buněk a uvolnit tak cytostatikum přímo u zhoubného nádoru [50, 51]. Tím sníží nežádoucí účinky daného léčiva. Další výhodou tohoto nanopřenašeče je možnost zvýšení jeho specifity vůči nádorovým buňkám modifikací jeho povrchu, což by vedlo ke snížení dávky léku, minimalizaci toxicity a k opětovnému snížení vedlejších nežádoucích účinků. Připojení peptidů či protilátek rozpoznávající receptory nádorových buněk lze provést kovalentní vazbou, fyzikální či hydrofobní adsorbci, anebo často používanou afinitou biotinu k streptavidinu [52].

2. Cíl práce

Cíle této práce je možné shrnout do následujících bodů:

- optimalizace přípravy enkapsulace dvou cytostatik, doxorubicinu a ellipticinu, do apoferritinové nanočástice,
- následná charakterizace stability proteinové struktury s enkapsulovaným ellipticinem (*ApoElli*) při -20 a 4 °C během 10 týdnů,
- charakterizace velikosti apoellipticinu (*ApoElli*) pomocí transmisní elektronové mikroskopie (*dále TEM*).

3. Materiál a metody

3.1 Chemikálie

Sigma, Aldrich (USA): doxorubicin, ellipticin, apoferritin (*horse spleen, 50 mg/ml*), heptansulfonát sodný, fenacetin;

Lach-Ner (ČR): ethylacetát, kyselina octová, methanol, NaOH, HCl;

Yaphank (NY, USA): Nano-W (Nanoprobes).

3.2 Přístroje

Analytické váhy Discovery, Ohaus (*Švýcarsko*);

filtrační mikrozkmavky Amicon Ultra-0.5, 3K 96pk, Millipore (*Německo*);

třepačka Thermomixer Eppendorf compact, Eppendorf (*Německo*);

centrifuga Centrifuge 5418, úhlový rotor, Eppendorf (*Německo*);

spektrofotometr Tecan, infinitive M200 Pro (*Švýcarsko*);

systém HPLC:

Dionex (*USA*): P580 pump, ASI-100 Automated Sample Injector, UV/VIS Detector UVD, 170S/340S, Degasys DG-1210,

termobox pro kolonu: Column Oven LCO 101, ECOM (*ČR*),

kolony: Nucleosil 100-5, C18, 250 × 4 mm, 5 µm, Macherey-Nagel (*Německo*),

Ultrasphere, ODS, C18, 250 × 4,6 mm, 5 µm, Beckman (*USA*), program: Chromeleon™ 6.11;

transmisní elektronový mikroskop Tecnai F20; FEI, Hillsboro, OR (*USA*).

3.3 Metody

3.3.1 Příprava apodoxorubicinu (*ApoDox*)

A) Příprava ApoDox pro různé počáteční objemy Apo:

1. Byl připraven zásobní roztok doxorubicinu (Dox) o koncentraci 1 mg/ml.
2. Ze zásobního roztoku Dox (1 mg/ml) bylo připraveno 5 roztoků o různé koncentraci Apo (50 mg/ml) v pořadí: deionizovaná voda, Dox, Apo dle tab. 3.1.

Tab. 3.1 – Schéma přípravy roztoků o různém počátečním objemu Apo:

Č. vzorku	V _{voda} / μ l	V _{Dox} / μ l	V _{Apo} / μ l
1.	418	200	2
2.	416		4
3.	410		10
4.	400		20
5.	380		40

3. K takto připraveným roztokům bylo přidáno 1,32 μ l 1 M HCl. Roztoky byly inkubovány za současného třepání (300 RPM, lab. teplota, 15 min). Poté bylo k roztokům přidáno 1,32 μ l 1 M NaOH a vzorky byly opět inkubovány za stejných podmínek.
4. Po 2. inkubaci byly roztoky centrifugovány (15 000 g, 3 min). Vzniklá peleta byla odstraněna a supernatant byl rozdělen na dvě poloviny, které byly diafiltrovány pomocí filtrů Amicon® Ultra – 0.5 ml 3K (Merck Millipore, Billerica, MA, USA).
5. Takto vzniklé vzorky byly opětovně centrifugovány (15 000 g, 5 min). Filtrát byl odebrán (tzv. nultý promývací cyklus). Do filtru bylo přidáno 300 μ l vody a vzorek byl znovu centrifugován (15 000 g, 5 min). Filtrát byl znovu odebrán (tzv. 1. promývací cyklus) a opětovně bylo přidáno 300 μ l vody. Naposledy byl vzorek centrifugován (15 000 g, 5 min) a opět odebrán filtrát (tzv. druhý promývací cyklus). Vzorek z filtru byl také odebrán.

6. Byly připraveny kalibrační roztoky Dox ze zásobního roztoku (1 mg/ml) dle tab. 3.2.

Tab. 3.2 – Schéma kalibračních roztoků Dox:

$c_{g, \text{Dox}} / \text{mg/ml}$	0,0	0,2	0,4	0,6
$V_{\text{Dox}} / \mu\text{l}$	0	5	10	15
$V_{\text{voda}} / \mu\text{l}$	25	20	15	10

7. Na mikrotitrační destičku bylo postupně pipetováno ke 200 μl vody 10 μl kalibračního roztoku nebo vzorku z promývacích cyklů (*volný Dox*) či z filtru (*ApoDox*). Pro kontrolu byly všechny vzorky pipetovány 2x. Kalibrační roztoky se vzorky z filtrů byly ředěny (*ke 100 μl vody bylo přidáno 100 μl daného roztoku*). Ke všem kalibračním roztokům a vzorkům z filtru byly přidány 2 μl 1 M HCl.
8. Byla měřena fluorescence takto připravených vzorků při excitační a emisní vlnové délce Dox 480 a 598 nm.
9. Pomocí programu Excel byl sestaven graf závislosti koncentrace vázaného Dox v ApoDox na počátečním objemu Apo.

B) Příprava ApoDox pro různé počáteční koncentrace Dox:

1. Byl připraven zásobní roztok Dox o koncentraci 1,25 mg/ml.
2. Ze zásobního roztoku Dox ($1,25 \text{ mg/ml}$) byly připraveny 4 roztoky dle schématu 3.3.

Tab. 3.3 – Schéma přípravy roztoků o různých počátečních koncentracích Dox:

$c_{g, \text{Dox}} / \text{mg/ml}$	1,00	0,75	0,50	0,25
$V_{\text{Dox}} / \mu\text{l}$	0,4	0,3	0,2	0,1
$V_{\text{voda}} / \mu\text{l}$	0,1	0,2	0,3	0,4

3. Následující postup je shodný s kroky 3 – 8 kapitoly 3.3.1A – Příprava ApoDox při různém počátečním objemu Apo (*str. 33 – 34*).

4. Pomocí programu Excel byl sestaven graf závislosti koncentrace vázaného Dox v ApoDox na počáteční koncentraci Dox.

C) Kontrola reverzibilní disociace Apo při přípravě ApoDox:

1. Byl připraven zásobní roztok Dox o koncentraci 1 mg/ml.
2. Z takto připraveného zásobního roztoku Dox (1 mg/ml) byla připravena série pěti kontrol (K1 – K5) a vzorku (V) dle tab. 3.4.

Tab. 3.4 – Příprava sérií kontrol a vzorku pro optimalizaci přípravy ApoDox:

Typ roztoku	V _{voda} / μl	V _{Dox} / μl	V _{Apo} / μl	V _{1M HCl} / μl	V _{1M NaOH} / μl
K1	420	200	-	-	-
K2	600	-	20		
K3	200	200		1,32	
K4				-	1,32
K5				1,32	
V					

3. K roztokům bylo přidáno 1,32 μ l 1 M HCl a 1,32 μ l 1 M NaOH dle tab. 3.4. Po přidavku kyseliny či báze vždy následovala inkubace roztoků za současného třepání (300 RPM, lab. teplota, 15 min).
4. Následující postup je shodný s kroky 4 – 8 z kapitoly 3.3.1A – Příprava ApoDox při různém počátečním objemu Apo (str. 33 – 34).
5. Pomocí programu Excel byl sestaven graf závislosti koncentrace vázaného Dox v ApoDox na typu testovaného roztoku.

3.3.2 Příprava apoellipticinu (ApoElli)

A) Příprava ApoElli pro různé počáteční objemy Apo:

1. Byl připraven zásobní roztok ellipticinu (Elli) o koncentraci 1 mg/ml a přidána 1 M HCl v poměru 150:1 (*celkový objem roztoku: objem přidané HCl*).
2. Ze zásobního roztoku Elli (1 mg/ml) bylo připraveno 6 roztoků o různé koncentraci Apo (50 mg/ml) v pořadí deionizovaná voda, Elli, Apo dle tab. 3.5.

Tab. 3.5 – Schéma přípravy roztoků ApoElli při různém objemu Apo:

Č. vzorku	V _{voda} / μ l	V _{Elli} / μ l	V _{Apo} / μ l
1.	418	200	2
2.	416		4
3.	410		10
4.	400		20
5.	380		40
6.	320		100

3. Roztoky byly inkubovány za současného třepání (300 RPM, lab. teplota, 15 min). Poté bylo k roztokům přidáno 1,32 μ l 1 M NaOH a vzorky opět inkubovány za stejných podmínek.
4. Po 2. inkubaci byly roztoky centrifugovány (15 000 g, 3 min). Vzniklá peleta byla odstraněna a supernatant byl rozdělen na dvě poloviny, které byly diafiltrovány pomocí filtrů Amicon® Ultra - 0.5 ml 3K (Merck Millipore, Billerica, MA, USA).
5. Takto vzniklé vzorky byly opětovně centrifugovány (15 000 g, 5 min). Filtrát byl odebrán (*tzv. nultý promývací cyklus*). K filtru bylo přidáno 300 μ l vody a vzorek byl znovu centrifugován (15 000 g, 5 min). Filtrát byl znovu odebrán (*tzv. 1. promývací cyklus*) a opětovně bylo přidáno 300 μ l vody. Naposledy byl vzorek centrifugován (15 000 g, 5 min) a opět odebrán filtrát (*tzv. druhý promývací cyklus*). Vzorek z filtru byl také odebrán.
6. Byly připraveny kalibrační roztoky Elli ze zásobního roztoku (1 mg/ml) dle tab. 3.6 (*str. 37*).

Tab. 3.6 – Schéma kalibračních roztoků Elli:

$c_{g,Elli} / \text{mg/ml}$	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
$V_{Elli} / \mu\text{l}$	0,0	22,5	5,0	7,5	10,0	12,5
$V_{voda} / \mu\text{l}$	25,0	2,5	20,0	17,5	15,0	12,5

- Na mikrotitrační destičku bylo postupně pipetováno ke 200 μl vody 10 μl kalibračního roztoku nebo vzorku z promývacích cyklů (*volný Elli*) či z filtru (*ApoElli*). Všechny roztoky byly pro kontrolu pipetovány 2x. Kalibrační roztoky se vzorky z filtrů byly ředěny (*ke 100 μl vody bylo přidáno 100 μl daného roztoku*). Ke všem kalibračním roztokům a vzorkům z filtrů byly přidány 2 μl 1 M HCl.
- Byla měřena fluorescence takto připravených vzorků při excitační a emisní vlnové délce Elli 434 a 541 nm.
- Pomocí programu Excel byl sestrojen graf závislosti koncentrace vázaného Elli v ApoElli na počátečním objemu Apo.

B) Příprava ApoElli pro různé počáteční koncentrace Elli:

- Byl připraven zásobní roztok Elli o koncentraci 1,25 mg/ml a přidána 1 M HCl v poměru 150:1 (*celkový objem roztoku: objem HCl*).
- Ze zásobního roztoku Elli (*1,25 mg/ml*) byly připraveny 4 roztoky dle schématu 3.7.

Tab. 3.7 – Schéma přípravy roztoků o různých koncentracích Elli:

$c_{g,Elli} / \text{mg/ml}$	1,00	0,75	0,50	0,25
$V_{Elli} / \mu\text{l}$	0,4	0,3	0,2	0,1
$V_{voda} / \mu\text{l}$	0,1	0,2	0,3	0,4

- Následující postup je shodný s kroky 3 – 8 kapitoly 3.3.1A – Příprava ApoElli pro různé počáteční objemy Apo (*str. 36 – 37*).

4. Pomocí programu Excel byl sestrojen graf závislosti koncentrace vázaného Elli v ApoElli na počáteční koncentrace Elli.

C) Kontrola reverzibilní disociace Apo při přípravě ApoElli:

1. Byl připraven zásobní roztok Elli o koncentraci 1 mg/ml a přidána 1M HCl v poměru 150:1 (*celkový objem: objem HCl*).
2. Z takto připraveného zásobního roztoku byla připravena série tří kontrol (*K1 – K3*) a vzorku (*V*), jak je uvedeno v tab. 3.8.

Tab. 3.8 – Příprava sérií kontrol a vzorku pro optimalizaci přípravy ApoElli:

Typ roztoku	V _{voda} / μl	V _{Elli} / μl	V _{Apo} / μl	V _{1M NaOH} / μl
K1	420	200	-	-
K2	600	-	20	
K3	400	200		
V			1,32	

3. Ke vzorku bylo přidáno 1,32 μ l 1 M NaOH dle tab. 3.8. Před a po přidavku báze byly roztoky inkubovány za současného třepání (*300 RPM, lab. teplota, 15 min*).
4. Následující postup je shodný s kroky 4 – 8 z kapitoly 3.3.1A – Příprava ApoElli pro různé počáteční objemy Apo (*str. 36 – 37*).
5. Pomocí programu Excel byl sestrojen graf závislosti koncentrace vázaného Dox v ApoDox na typu testovaného roztoku.

3.3.3 Charakterizace stability ApoElli při -20 a 4 °C

1. Byl připraven zásobní roztok Elli o koncentraci 1 mg/ml a přidána 1 M HCl v poměru 150:1 (*celkový objem roztoku: objem HCl*).
2. Ke 2 ml destilované vody byl přidán 1 ml zásobního roztoku Elli (*1 mg/ml*) a 200 µl Apo (*50 mg/ml*). Bylo upraveno pH z hodnoty 6,7 na 2,7 pomocí 1 M HCl. Roztok byl inkubován za stálého třepání (*300 RPM, lab. teplota, 15 min*). Po 1. inkubaci bylo přidáno 6,6 µl 1 M NaOH. Roztok byl znovu inkubován za stejných podmínek. Po ukončení 2. inkubace byl roztok centrifugován (*6 000 g, 5 min*) a 300 µl supernatantu bylo přeneseno na centrifugační filtry (*Amicon® Ultra - 0.5 ml 3K, Merck Millipore, Billerica, MA, USA*).
3. Vzorek byl třikrát diafiltrován 300 µl destilované vody při 13 000 g po dobu 5 minut.
4. Obsah Elli vázaného v Apo byl stanoven za použití fluorescenční detekce (*excitační a emisní vlnová délka 434 a 541 nm*). Konečná koncentrace Elli ve vzorku ApoElli byla 0,46 mg/ml. Z filtrů bylo odebráno 150 µl roztoku ApoElli a doplněno vodou na 600 µl. Celkem bylo připraveno 6 ml roztoku. Bylo odebráno 500 µl zásobního roztoku, který byl skladován při -20 °C v mrazícím boxu a 4 °C v lednici po dobu až deseti týdnů.
5. Po uplynutí požadované doby skladování bylo k 500 µl zásobního roztoku ApoElli přidáno 10 µl fenacetinu. Bylo odebráno 150 µl vzorku a promyto 300 µl deionizované vody za použití centrifugačních filtrů Amicon® Ultra - 0.5 ml 3K (*Merck Millipore, Billerica, MA, USA*) při 15 000 g po dobu 5 min. Vzorky byly takto připraveny v tripletech.
6. Z promytého vzorku ApoElli bylo odebráno 100 µl ApoElli a pomocí 1 ml ethylacetátu byl extrahován Elli. Rozpouštědlo bylo odpařeno do sucha a odparek byl rozpuštěn v 25 µl MeOH.

7. Koncentrace vázaného Elli byla stanovena pomocí HPLC. Takto se stanovily koncentrace Elli vázaného v ApoElli v průběhu 10 týdnů při –20 a 4 °C.
8. Pomocí programu Excel byl vytvořen graf závislosti koncentrace vázaného Elli v ApoElli na čase za dvou teplot. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí Studentova t-testu.

3.3.4 Charakterizace velikosti ApoElli

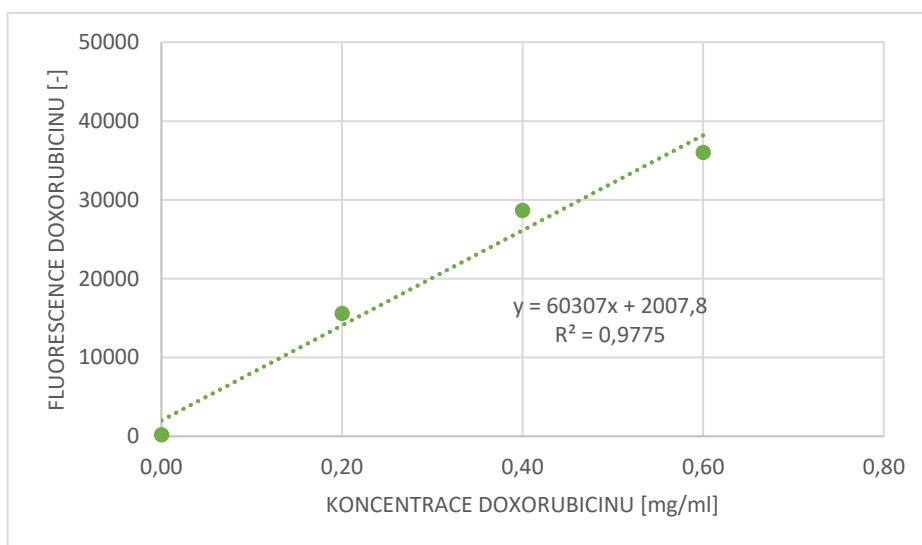
1. Ze zásobního roztoku ApoElli (*viz kap. 3.3.3 – Charakterizace stability ApoElli při –20 a 4 °C, str. 39 – 40*) o koncentraci 0,46 mg/ml byly odebrány 4 µl vzorku a naneseny na měděnou mřížku potaženou spojitou vrstvou uhlíku. Vzorek byl vizualizován pomocí negativní barvicí techniky. K tomuto účelu byla použita organowolframová sloučenina Nano-W (*Nanoprobes, Yaphank, NY, USA*).
2. Pomocí TEM (*Tecnai F20; FEI, Hillsboro, OR, USA*) byl vzorek vizualizován při zvětšení 80 000x.

4. Výsledky

4.1 Optimalizace přípravy nanotransportérů apoferritinu

4.1.1 Optimalizace přípravy apodoxorubicinu (*ApoDox*)

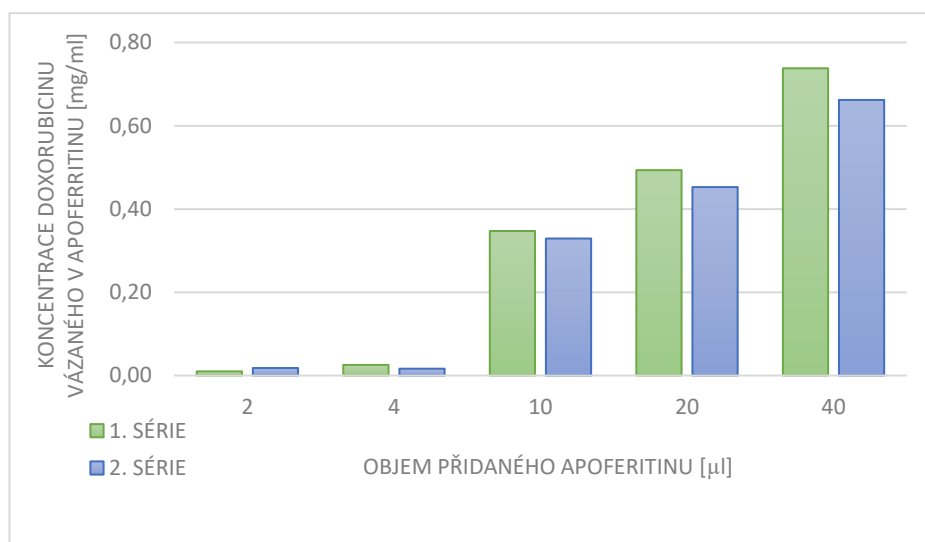
ApoDox byl připraven dle postupu uvedeného v kapitole 3.3.1 – Příprava ApoDox (str. 33 – 35). Zjištěná fluorescence tohoto systému byla následně přepočítána na hmotnostní koncentraci Dox při excitační a emisní vlnové délce 480 a 598 nm. Kalibrační křivka pro přepočet fluorescence na hmotnostní koncentraci Dox je uvedena na obr. 4.1.



Obr. 4.1 - Kalibrační křivka Dox: závislost fluorescence Dox na hmotnostní koncentraci Dox. Data v grafu jsou průměrem dvou paralelních měření.

Pro zjištění optimálního množství apoferritinu (*Apo*) o koncentraci 50 mg/ml byly použity různé objemy jeho roztoků (2; 4; 10; 20 a 40 μ l *Apo*) při konstantním množství Dox (200 μ l Dox o koncentraci 1 mg/ml). Veškerý zachycený Dox v ApoDox byl stanoven pomocí fluorescenční spektroskopie. Na obr. 4.2 (str. 42) jsou zobrazeny hodnoty hmotnostní koncentrace Dox vázaného v ApoDox při různých objemech Apo.

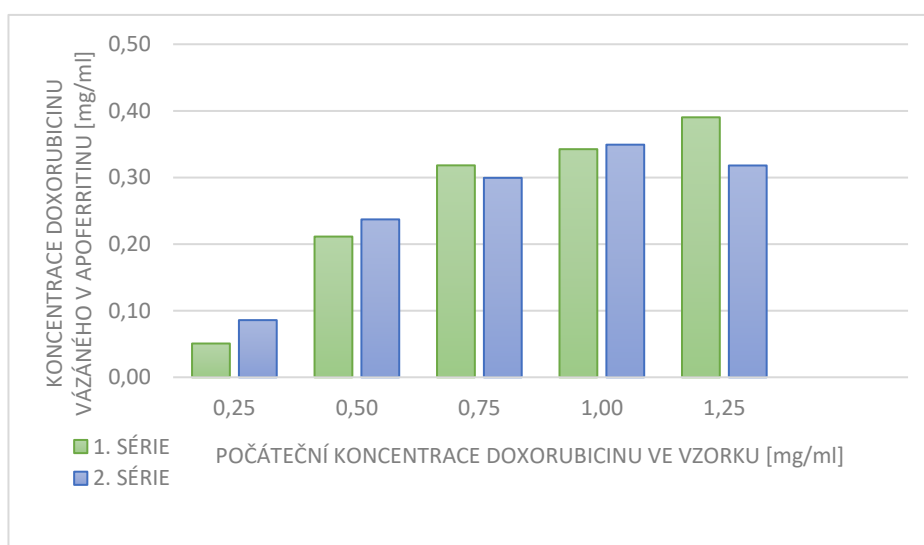
Při nízkém množství Apo se enkapsuluje jen nepatrné množství Dox. Se vzrůstající koncentrací nanočástice ve vzorku se toto množství cytostatika rovněž zvyšuje, protože cytostatikum se může lépe distribuovat mezi větší počet proteinových apoferritinových nanočástic v roztoku.



Obr. 4.2 - Závislost koncentrace Dox vázaného v ApoDox na objemu přidaného Apo.
Data v grafu jsou průměrem dvou paralelních měření.

K určení vhodné počáteční koncentrace Dox bylo použito vždy 200 μl Dox o různých koncentracích (0,25; 0,50; 0,75; 1,00 a 1,25 mg/ml). K tomuto množství Dox bylo vždy přidáno 20 μl Apo (50 mg/ml). Obr. 4.3 popisuje závislost množství Dox vázaného v ApoDox na počáteční koncentraci Dox ve vzorku.

Se vzrůstající koncentrací léčiva vzrůstá i jeho množství vázaného v Apo. Při vyšších koncentracích Dox je Apo satureován cytostatikem, a proto je jeho množství přibližně stejné. Další zvyšování koncentrace Dox je tak zbytečné, neboť Apo byl zcela satureován a nepojme již další léčivo.

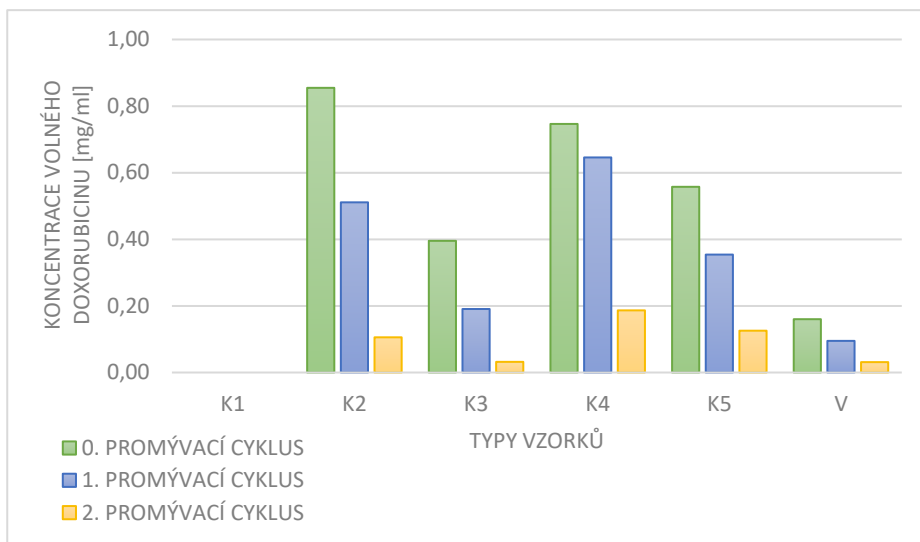


Obr. 4.3 – Závislost koncentrace Dox vázaného v ApoDox na počáteční koncentraci Dox ve vzorku.
Data v grafu jsou průměrem dvou paralelních měření.

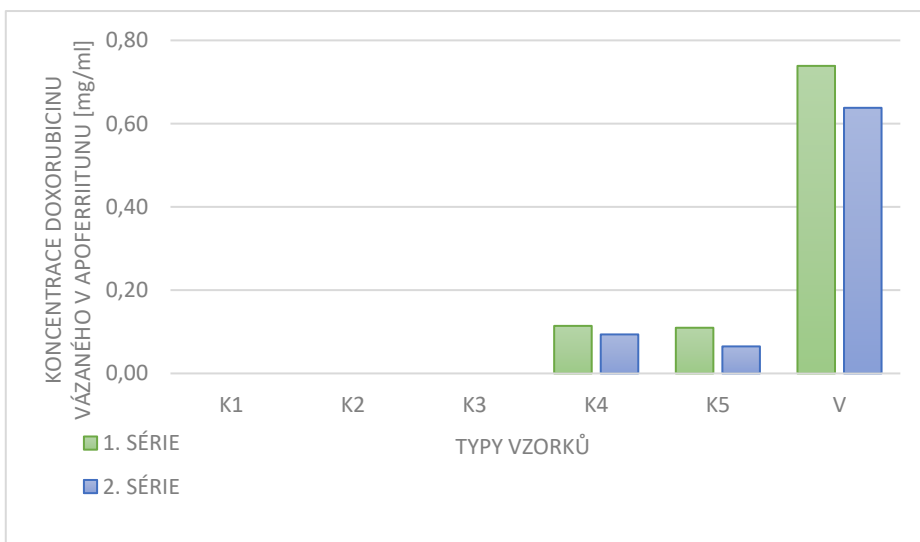
Schopnost Apo reverzibilně disociovat v kyselém prostředí a enkapsulace Dox byla ověřena sérií kontrol. Po určení optimálního počátečního množství Apo a Dox byl připraven vzorek (V): 200 μ l Dox (1 mg/ml), 20 μ l Apo (50 mg/ml) a doplněno na 620 μ l destilovanou vodou. K takto připravenému roztoku bylo přidáno 1,32 μ l 1 M HCl. Po 1. inkubaci za současného třepání (15 min, lab. teplota, 300 RPM) bylo přidáno 1,32 μ l 1 M NaOH a roztok byl opět inkubován. Kontrola 1 (K1) neobsahovala Dox, kontrola 2 (K2) neobsahovala Apo. Do kontrol 1 – 3 nebyla přidána kyselina a ani báze během inkubace. Do kontroly 4 (K4) nebyla přidána báze a do kontroly 5 (K5) kyselina (báze však ano). Na obr. 4.4 (str. 44) jsou uvedeny koncentrace volného Dox během promývacích cyklů a na obr. 4.5 (str. 44) koncentrace vázaného Dox v ApoDox po všech promývacích cyklech.

Ve všech kontrolách (vyjma K1) se koncentrace volného Dox během promývání nanočástic (tzv. *promývacích cyklů*) postupně snižovala. V kontrole K1 se Dox nenacházel. Celkem byl ApoDox promyt 2x. Nultý promývací cyklus označuje odběr vzorku po druhé inkubaci. Postup je detailněji rozebrán v kapitole 3.3.1C – Příprava ApoDox (str. 35).

Koncentrace volného léčiva ve vzorku je podstatně nižší než u kontrol 2 – 5, naopak vázaného Dox v ApoDox je ve vzorku podstatně větší množství než v kontrolách 4 a 5, v kontrolách 1 – 3 dokonce k enkapsulaci cytostatika nedošlo vůbec. V tomto případě se majoritní podíl Dox enkapsuloval do Apo, zatímco u kontrol nikoliv. Do kontrol 2 – 3 a 5 nebyla totiž přidána kyselina a ani báze během inkubace. Proteinová klec tedy nemohla reverzibilně disociovat a nemohlo dojít k enkapsulaci Dox. U kontroly 4 nebyla přidána báze, a tak se nemohl Apo opětovně „sbalit“ a většina léčiva prošla přes filtr.



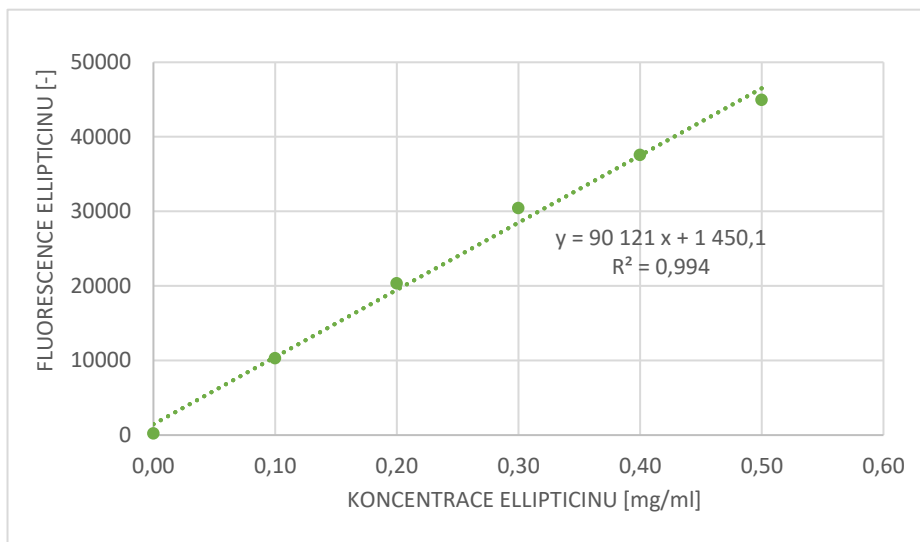
Obr. 4.4 – Závislost koncentrace volného Dox na typu testovaného roztoku během promývacích cyklů nanočástic: vzorek – V (200 μ l 1 mg/ml Dox + 20 μ l Apo + 400 μ l vody + 1,32 μ l 1 M HCl, po 1. inkubaci přidáno 1,32 μ l 1 M NaOH a roztok opět inkubován), kontrola 1 - K1 (20 μ l Apo + 600 μ l vody), kontrola 2 – K2 (200 μ l 1 mg/ml Dox + 420 μ l vody), kontrola 3 – K3 (200 μ l 1 mg/ml Dox + 20 μ l Apo + 400 μ l vody); ke kontrolám 1 – 3 nebyla přidána kyselina ani báze, kontrola 4 – K4 (viz V, nebyla přidána báze), kontrola 5 – K5 (viz V, nebyla přidána kyselina). Graf zobrazuje promývací cykly – ■ 0. promývací cyklus (stanovení koncentrace po druhé inkubaci), ■ 1. promývací cyklus (stanovení koncentrace po 1. přidavku 300 μ l vody) a ■ 2. promývací cyklus (stanovení koncentrace po 2. přidavku 300 μ l vody). Data v grafu jsou průměrem dvou paralelních měření.



Obr. 4.5 – Závislost koncentrace Dox vázaného v ApoDox na typu testovaného roztoku nanočástic: vzorek – V (200 μ l 1 mg/ml Dox + 20 μ l Apo + 400 μ l vody + 1,32 μ l 1 M HCl, po 1. inkubaci přidáno 1,32 μ l 1 M NaOH a roztok opět inkubován), kontrola 1 - K1 (20 μ l Apo + 600 μ l vody), kontrola 2 – K2 (200 μ l 1 mg/ml Dox + 420 μ l vody), kontrola 3 – K3 (200 μ l 1 mg/ml Dox + 20 μ l Apo + 400 μ l vody); ke kontrolám 1 – 3 nebyla přidána kyselina ani báze, kontrola 4 – K4 (viz V, nebyla přidána báze), kontrola 5 – K5 (viz V, nebyla přidána kyselina). Data v grafu jsou průměrem dvou paralelních měření.

4.1.2 Optimalizace přípravy apoellipticinu (*ApoElli*)

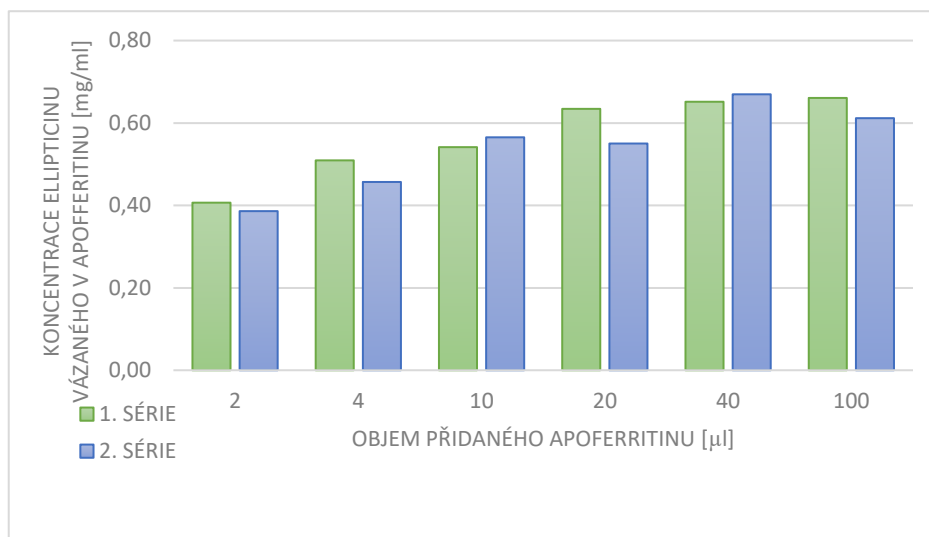
Optimalizace a postup přípravy ApoElli jsou velmi podobné s optimalizací přípravy ApoDox. Postup přípravy ApoElli je uveden v kapitole 3.3.2 – Příprava ApoElli (str. 35 – 38). Pro přepočet fluorescence částic na hmotnostní koncentraci ellipticinu (*Elli*) byla sestavena kalibrační křivka, jenž je uvedena na obr. 4.6.



Obr. 4.6 – Kalibrační křivka Elli: závislost fluorescence Elli na koncentraci Elli. Data v grafu jsou průměrem dvou paralelních měření.

K určení vhodného množství Apo bylo připraveno několik roztoků s různými objemy Apo (2; 4; 10; 20; 40 a 100 ml Apo o koncentraci 50 mg/ml) s konstantním množstvím 200 μ l Elli o koncentraci 1 mg/ml. Veškerý Elli zachycený v ApoElli byl stanoven pomocí fluorescenční spektroskopie při excitační a emisní vlnové délce 434 a 541 nm. Obr. 4.7 (str. 46) popisuje měření koncentrace Elli vázaného v ApoElli.

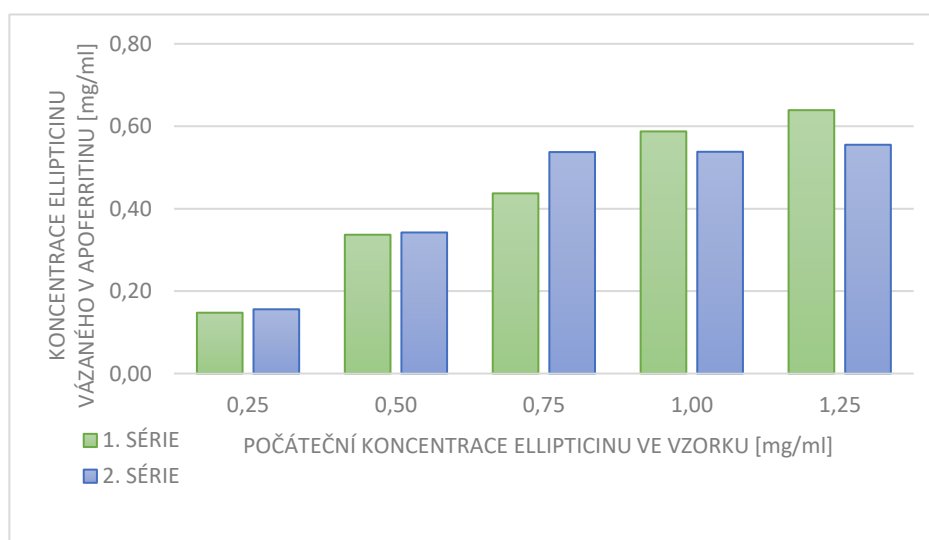
Při zvyšování objemu Apo se zvyšuje i množství enkapsulovaného cytostatika. Od určitého množství Apo (20 μ l) dochází k saturaci proteinu apoferritinu a množství enkapsulovaného Elli se liší nepatrně.



Obr. 4.7 – Závislost koncentrace Elli vázaného v ApoElli na objemu přidávaného Apo. Data v grafu jsou průměrem dvou paralelních měření.

Pro určení vhodné koncentrace Elli byla připravena série roztoků s 200 μl Elli o různých koncentracích (0,25; 0,50; 0,75; 1,00 a 1,25 mg/ml). K tomuto množství Elli bylo vždy přidáno 20 μl Apo (50 mg/ml). Na obr. 4.8 je uvedena závislost koncentrace Elli vázaného v ApoElli na počáteční koncentraci Elli ve vzorku.

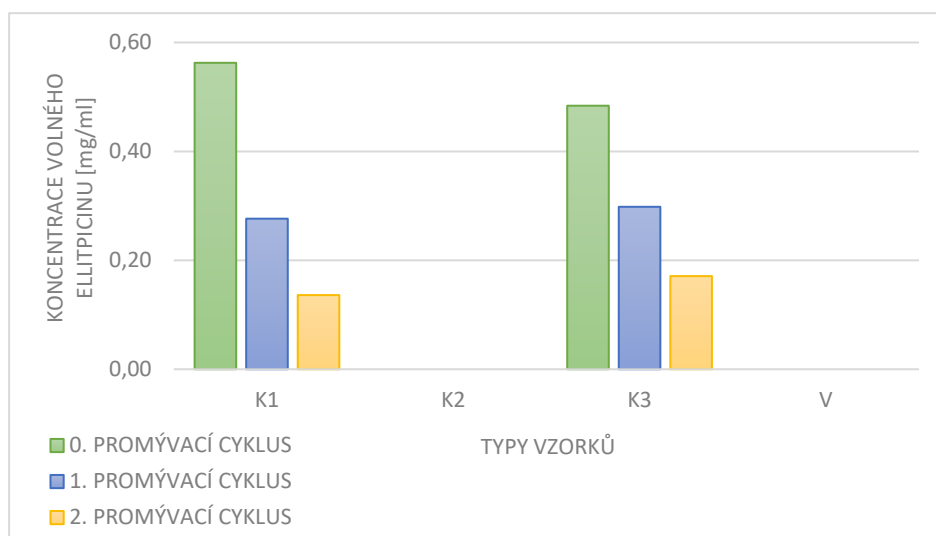
Se zvyšující se koncentrací Elli se opět zvyšuje množství zachyceného Elli ve vzorku, nicméně po překročení počáteční koncentrace 1,00 mg/ml Elli je apoferritinový protein saturován a koncentrace léčiva vázaného v ApoElli je přibližně konstantní.



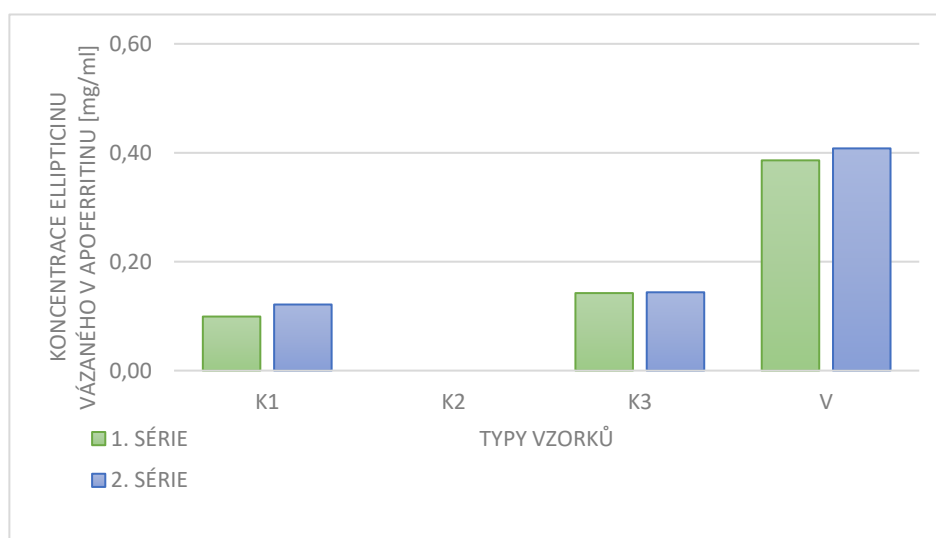
Obr. 4.8 – Závislost koncentrace Elli vázaného v ApoElli na počáteční koncentraci Elli ve vzorku. Data v grafu jsou průměrem dvou paralelních měření.

Stejně jako v případě ApoDox, i u ApoElli byla ověřena schopnost Apo reverzibilně disociovat pomocí sérií kontrol (*postup provedení je uveden v kapitole 3.3.2C – Příprava ApoElli, str. 38*). Nejdříve byl připraven vzorek (V): 200 μ l Elli (1 mg/ml), 20 μ l Apo (50 mg/ml) a 400 μ l vody. Po 1. inkubaci za současného třepání (15 min, laboratorní teplota, 300 RPM) bylo přidáno 1,32 μ l 1 M NaOH a roztok byl opět inkubován. Kontrola 3 (K3) je shodná se vzorkem, pouze po inkubaci nebyla přidána báze. Ke kontrolám 1 (K1 – 420 μ l vody a 200 μ l 1 mg/ml Elli) a 2 (K2 – 600 μ l vody a 20 μ l Apo o koncentraci 50 mg/ml) nebyla přidána báze. Na obr. 4.9 (str. 48) a 4.10 (str. 48) jsou zobrazeny koncentrace volného Elli a Elli vázaného v ApoElli v sérii promývacích cyklů. Celkem byl ApoElli promyt 2x. Nultý promývací cyklus označuje odběr vzorku po druhé inkubaci.

Koncentrace volného Elli v kontrolách 1 a 3 se postupně snižovala během promývání. U kontroly K2 k enkapsulaci nemohlo dojít, neboť nebylo přítomné žádné cytostatikum. Na druhou stranu koncentrace volného Elli ve vzorku byla také nulová, neboť se všechno enkapsulovalo do ApoElli, jak je patrné z obr. 4.10. (str. 48). Jisté množství Elli se také nacházelo ve filtru kontrol 1 a 3, ačkoliv nemohlo být enkapsulované v proteinu apoferitinu. Ke kontrolám 1 a 3 nebyla přidána před 2. inkubací báze, nemohlo tak dojít ke zpětnému sestavení Apo. Díky hydrofobnímu charakteru Elli se mohly částice shlukovat nebo interagovat s nepolárními skupinami samotných podjednotek proteinu.



Obr. 4.9 – Závislost koncentrace volného Elli na typu testovaného roztoku nanočástic: vzorek – V (200 μ l 1 mg/ml Elli + 20 μ l Apo + 400 μ l vody, po 1. inkubaci (15 min, laboratorní teplota, 300 RPM přidáno 1,32 μ l 1 M NaOH a roztok opět inkubován), kontrola 1 - K1 (200 μ l 1 mg/ml Elli + 420 μ l vody), kontrola 2 – K2 (20 μ l Apo + 600 μ l vody), kontrola 3 – K3 (200 μ l 1 mg/ml Elli + 20 μ l Apo + 400 μ l vody); ke kontrolám 1 – 3 nebyla přidána báze. Graf zobrazuje promývací cykly – ■ 0. promývací cyklus (stanovení koncentrace po druhé inkubaci), ■ 1. promývací cyklus (stanovení koncentrace po 1. přidavku 300 μ l vody) a ■ 2. promývací cyklus (stanovení koncentrace po 2. přidavku 300 μ l vody). Data v grafu jsou průměrem dvou paralelních měření.



Obr. 4.10 – Závislost koncentrace vázaného Elli v ApoElli na typu testovaného roztoku nanočástic: vzorek – V (200 μ l 1 mg/ml Elli + 20 μ l Apo + 400 μ l vody, po 1. inkubaci (15 min, laboratorní teplota, 300 RPM přidáno 1,32 μ l 1 M NaOH a roztok opět inkubován), kontrola 1 - K1 (200 μ l 1 mg/ml Elli + 420 μ l vody), kontrola 2 – K2 (20 μ l Apo + 600 μ l vody), kontrola 3 – K3 (200 μ l 1 mg/ml Elli + 20 μ l Apo + 400 μ l vody); ke kontrolám 1 – 3 nebyla přidána báze. Data v grafu jsou průměrem dvou paralelních měření.

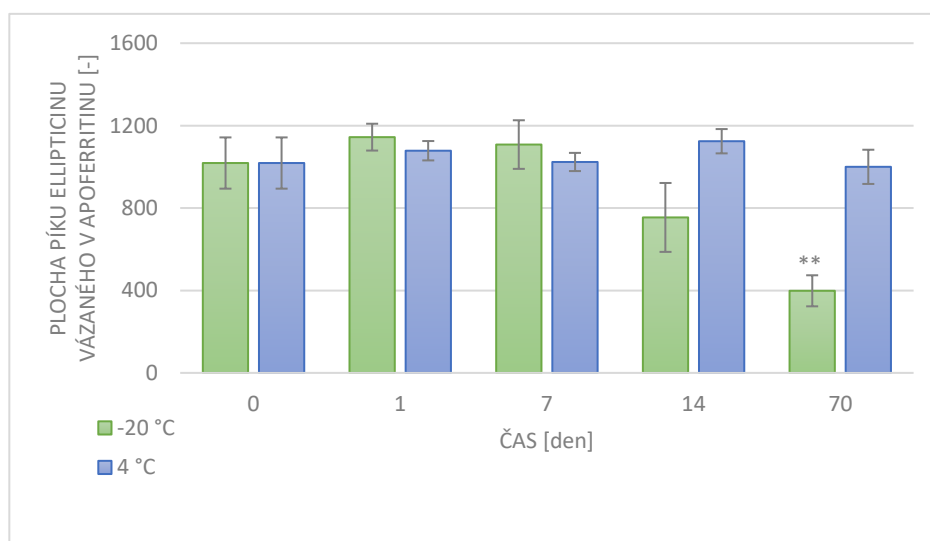
4.2 Charakterizace ApoElli

Charakterizace ApoElli byla provedena Mgr. Radkem Indrou Ph.D. (*Katedra biochemie, PŘF UK; postup je uveden v kapitole 3.3.3 – Charakterizace stability ApoElli při -20 a 4 °C; str. 39 – 40*) a vědeckým týmem z Mendelovy univerzity v Brně (*Laboratoř metalomiky a nanotechnologie; postup uveden v kapitole 3.3.4 – Charakterizace velikosti ApoElli; str. 40*).

4.2.1 Vliv teploty na stabilitu ApoElli

Připravené vzorky ApoElli byly skladovány při teplotách -20 a 4 °C po dobu až deseti týdnů. Přebytný Elli byl odstraněn ze vzorků v určitých periodách pomocí diafiltrace. Koncentrace enkapsulovaného Elli byla stanovena pomocí HPLC (*podrobnější postup je uveden v kapitole 3.3.3 – Charakterizace stability ApoElli při -20 a 4 °C; str. 38 – 39*).

Na obr. 4.11 je zobrazena závislost množství Elli vázaného v ApoElli (*plocha píku*) v časovém horizontu při teplotách -20 a 4 °C. Při skladování v lednici při 4 °C bylo ApoElli stabilní dva týdny. Během 10. týdnu se koncentrace Elli v ApoElli nepatrně snížila. Pokud byl vzorek skladován v mrazícím boxu při -20 °C, již po 2. týdnu koncentrace Elli vázaného v ApoElli klesla přibližně o třetinu a v 10. týdnu klesla dokonce na méně než polovinu počáteční hodnoty.

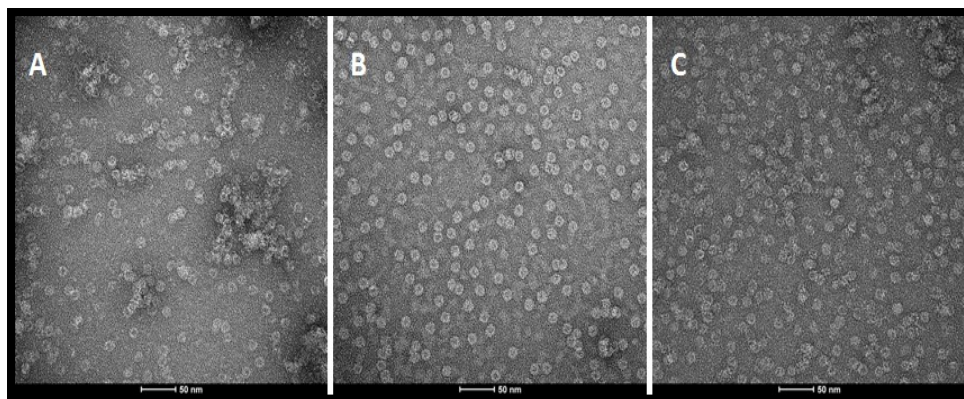


Obr. 4.11 – Závislost plochy píku Elli vázaného v ApoElli na časovém horizontu při – 20 (■) a 4 (■) °C. Data v obrázku jsou průměrem tří paralelních měření (\pm SD, $n=3$). Pomocí Studentova t-testu byla prokázána signifikantní změna v čase 70 dní při – 20 °C oproti analýze v čase 0.

4.2.2 Charakterizace velikosti ApoEII

Velikost ApoEII byla stanovena pomocí TEM s negativní barvicí technikou pomocí organowolframové sloučeniny Nano-W (*postup přípravy a vlastního stanovení je uveden v kapitole 3.3.4 – Charakterizace velikosti ApoEII; str. 40*). Na obr. 4.12 jsou uvedeny velikosti Apo a ApoEII v různých fázích přípravy a testování stability.

Obr. 4.12A ukazuje snímek z TEM samotného Apo. Průměr nanočástice je přibližně 11,7 nm. Čerstvě připravený ApoEII je zachycen na obr. 4.12B. Jeho průměr je přibližně 10,1 nm, tedy o 1,6 nm menší než samotného Apo. Obr. 4.12C rovněž ukazuje ApoEII, avšak po měsíčním skladování při 4 °C. Průměry čerstvě připraveného a uskladněného ApoEII po 1 měsíci při 4 °C jsou analogické.



Obr. 4.12 – TEM snímek: samotný Apo (A), čerstvě připravený ApoEII (B) a ApoEII po 1 měsíci skladování při 4 °C (C).

5. Diskuze

Jak již bylo v úvodní části práce uvedeno, vedlejší účinky cytostatik jsou největším problémem při léčbě nádorového onemocnění. Proto se hledají způsoby, jak tyto nežádoucí účinky snížit. Jedním ze způsobů, jak tyto vedlejší účinky snížit, je nanomedicína. Existuje celá řada nanosystémů, které jsou schopny cíleně dopravit cytostatikum k nádorovým buňkám a uvolnit léčivo v okolí nádoru. Tím se výrazně sníží distribuce léčiva mezi zdravou tkání.

Jedním z potenciálních nanotransportérů použitelných v chemoterapii je apoferritin (*Apo*), tedy apo-forma ferritinu, proteinu zodpovědného za „vychytávání“ iontů železa. Při odstranění těchto iontů železa vznikne „kavýta“, do které lze enkapsulovat léčivo. Mezi hlavní výhody tohoto proteinu patří jeho reverzibilní disociace v již slabě kyselém prostředí a jeho biodegradabilita.

V rámci této bakalářské práce byla studována dvě různá cytostatika – doxorubicin (*Dox*) a ellipticin (*Elli*). *Dox* patří mezi nejpoužívanější cytostatikum v klinické praxi, naneštěstí je zároveň kardiotoxický. *Elli* působí proti řadě nádorových onemocnění, naneštěstí díky jeho vysokému hydrofobnímu charakteru a vedlejších účincích je jeho klinické použití omezené.

Úspěšně byla připravena enkapsulovaná léčiva apoferritinového nanopřenašeče – apodoxorubicin (*ApoDox*) a apoellipticin (*ApoElli*). Zároveň byla potvrzena schopnost *Apo* reverzibilně disociovat v kyselém prostředí v obou případech cytostatik *Dox* a *Elli*.

V případě *ApoElli* byly částice částečně charakterizovány. V práci byla studována stabilita *ApoElli* během deseti týdnů při teplotách -20 a 4 °C (obr. 4.11, str. 49). Při 4 °C byl *ApoElli* stabilní po celou dobu experimentu. Při -20 °C se z *ApoElli* již po 2. týdnu snižovala koncentrace *Elli* a po 10. týdnu se koncentrace vázaného *Elli* v *ApoElli* snížila více než na polovinu. Při nízké teplotě proteinová struktura *Apo* pravděpodobně denaturovala, což má za následek narušení proteinové apoferritinové klece a vyloučení vázaného *Elli* do okolního prostoru.

Pomocí TEM byla charakterizována velikost *Apo* a *ApoElli* v různých fázích studia stability (čerstvě připravený *ApoElli* a *ApoElli* po měsíčním skladování při 4 °C). Jak je patrné z obr. 4.12 (str. 50), *ApoElli* nanočástice jsou od *Apo* nanočástic částečně

odlišné. Všechny tři typy nanočástic vykazují kulovitý tvar. Volný Apo má větší průměr než ApoElli. Proteinová klec Apo se může díky vyššímu hydrofobnímu efektu, který zvyšuje již hydrofobní charakter vázaného Elli, k sobě blíže „semknout“. Z tohoto nejpravděpodobnějšího důvodu pozorujeme snížený průměr ApoElli nanočástic. V případě některých apoferritinových nanočástic může docházet k agregaci, jak je patrné z obr. 4.12A (*str. 50*). Připravený ApoElli je v tomto směru stabilní a za studovaných podmínek neagreguje (*obr. 4.12B a C, str. 50*).

Jak již bylo uvedeno, Apo je biologicky odbouratelný protein. Dalšími výhodami Apo pro využití v chemoterapii jsou jeho možnosti enkapsulovat léčivo do „kavity“ a jeho schopnost reverzibilně disociovat v kyselém prostředí. To dává možnost využití Apo v protinádorové léčbě, kde nádory vykazují tzv. „Warburgův efekt“ a jejich okolí je na rozdíl od okolí zdravé tkáně slabě kyselé vlivem laktátu tvořeného anaerobní glykolýzou. Léčivo se může z tohoto nanotransportéru uvolnit až v blízkosti nádorových buněk, čímž se značně sníží vedlejší účinky cytostatika na zdravou tkáň. Bez nanotransportéru je v případě hydrofobního charakteru Elli navíc problematická i distribuce krevním řečištěm. Jeho relativně vysoká stabilita při 4 °C po dobu deseti týdnů dává další potenciální využití v podobě dlouhodobého skladování připraveného ApoElli.

V další práci se zaměříme na podrobnější charakteristiku ApoElli, zejména na studium uvolňování Elli z ApoElli při různých hodnotách pH.

6. Závěr

Výsledky této bakalářské práce lze shrnout do následujících bodů:

- ✓ V práci byly připraveny nanočástice apodoxorubicin a apoellipticin, jejichž příprava byla optimalizována,
- ✓ ApoElli je stabilní při 4 °C po dobu deseti týdnů,
- ✓ při -20 °C se během 10. týdne skladování uvolnilo značné množství léčiva,
- ✓ všechny apoferritinové nanočástice vykazují kulovitý tvar,
- ✓ průměr Apo je přibližně o 1,6 nm větší než průměr ApoElli,
- ✓ připravený ApoElli v roztoku neagreguje.

7. Seznam použité literatury

- [1] Novotvary [online]. Praha: ÚZIS ČR, Národní onkologický registr ČR, 2015 [cit. 2017-10-23]. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/katalog/zdravotnicka-statistika/novotvary>.
- [2] PÉREZ-HERRERO E. a FERNÁNDEZ-MEDARDE A.: Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **93**, 52-79 (2015).
- [3] BACHUR N. R., GEE M. V. a FRIEDMAN R. D.: Nuclear catalyzed antibiotic free radical formation. *Cancer Res.*, **42**, 1078-1081 (1982).
- [4] CAMPBELL N. A. a REECE J. B.: Biologie. Computer Press, a. s., Brno (2006).
- [5] DOUCAS H. a BERRY D. P.: Basic principles of the molecular biology of cancer I. *Surgery (Oxford)*, **24**, 43-47 (2006).
- [6] GAGGIOLI C., HOOPER S., HIDALGO-CARCEDO C., GROSSE R., MARSHALL J. F., HARRINGTON K. a SAHAI E.: Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat. Cell Biol.*, **9**, 1392-1400 (2007).
- [7] KLENER P.: Základy klinické onkologie. Galén, Praha (2011).
- [8] VORLÍČEK J., ABRAHÁMOVÁ J. a VORLÍČKOVÁ H.: Klinická onkologie pro sestry. Grada, Praha (2006).
- [9] BUŽGOVÁ R.: Paliativní péče ve zdravotnických zařízeních: potřeby, hodnocení, kvalita života. Grada, Praha (2015).

- [10] KLENER P.: Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii. Grada, Praha (2010).
- [11] KLENER P.: Principy systémové protinádorové léčby. Grada, Praha (2013).
- [12] SAGNELLA S. M., MCCARROLL J. A. a KAVALLARIS M: Drug delivery: Beyond active tumour targeting. *Nanomedicine (N. Y.)*, **10**, 1131-1137 (2004).
- [13] MINOTTI G., MENNA P., SALVATORELLI E., CAIRO G. a GIANNI L.: Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.*, **56**, 185-229 (2004).
- [14] CUTTS S. M., NUDELMAN A., REPHAELI A. a PHILLIPS D. R.: The power and potential of doxorubicin-DNA adducts. *IUBMB Life*, **57**, 73-81 (2005).
- [15] RIVANKAR S.: An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J. Cancer Res. Ther.*, **10**, 853-858 (2014).
- [16] YANG F., TEVES S. S. a KEMP C. J.: Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim. Biophys. Acta*, **1845**, 84-89 (2014).
- [17] KIZEK R., ADAM V., HRABETA J., ECKSCHLAGER T., SMUTNÝ S., BURDA J. V., FREI E. a STIBOROVÁ M.: Anthracyclines and ellipticines as DNA-damaging anticancer drugs: Recent advances. *Pharmac. Ther.*, **131**, 26-39 (2012).
- [18] HYNEK D., KREJČOVÁ L., ZÍTKA O., ADAM V., TRNKOVÁ L., SOCHOR J., STIBOROVÁ M., ECKSCHLAGER T., HUBÁLEK J. a KIZEK R.: Electrochemical study of doxorubicin interaction with different sequences of single stranded oligonucleotides, Part I. *Int. J. Electrochem. Sci.*, **7**, 13-33 (2007).
- [19] CHATTERJEE K., ZHANG J., HONBO N. a KARLINER J. S.: Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology*, **115**, 155-162 (2010).

- [20] STIBOROVÁ M. a FREI E.: Ellipticines as DNA-targeted chemotherapeutics. *Curr. Med. Chem.*, **21**, 575-591 (2014).
- [21] STIBOROVÁ M., RUPERTOVÁ M. a FREI E.: Cytochrome P450- and peroxidase-mediated oxidation of anticancer alkaloid ellipticine dictates its anti-tumor efficiency. *Biochim. Biophys. Acta*, **1814**, 175-185 (2011).
- [22] STIBOROVÁ M., RUPERTOVÁ M., SCHMEISER H. H. a FREI E.: Molecular mechanism of antineoplastic action of an anticancer drug ellipticin. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc*, **150**, 13-23 (2006).
- [23] STIBOROVÁ M., HUDEČEK J., HODEK P. a FREI E.: Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. Listy*, **93**, 229-237 (1999).
- [24] MONTELLANO O., PAUL R.: Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry. *Kluwer Academic Publishers*, New York (2005).
- [25] DRBOHLAVOVÁ J., CHOMOUCKÁ J., ADAM V., RYVOLOVÁ M., ECKSCHLAGER T., HUBÁLEK J. a KIZEK R.: Nanocarriers for anticancer drugs – New trends in nanomedicine. *Curr. Drug Metab.*, **14**, 547-564 (2013).
- [26] SINGHAL S., NIE S. a WANG M. D.: Nanotechnology applications in surgical oncology. *Annu. Rev. Med.*, **61**, 359-373 (2010).
- [27] WANG A. Z. a TEPPER J. E.: Nanotechnology in radiation oncology. *J. Clin. Oncol.*, **32**, 2879-2885 (2014).
- [28] WANG A. Z., LANGER R. a FAROKHZAD O. C.: Nanoparticle delivery of cancer drugs. *Annu. Rev. Med.*, **63**, 185-198 (2012).
- [29] HEGER Z., ECKSCHLAGER T., STIBOROVÁ M., ADAM V. a KIZEK R.: Moderní nanomedicína v léčbě karcinomů plic. *Klin. Onkol.*, **28**, 245-250 (2015).

- [30] WICKI A., WITZIGMANN D., BALASUBRAMANIAN V. a HUWYLER J.: Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. *J. Controlled Release*, **200**, 138-157 (2015).
- [31] LENGÁLOVÁ A.: Studium vlastností protinádorových léčiv ellipticinu, etoposidu a doxorubicinu ve formě nanočástic, Diplomová práce, PŘF UK, katedra biochemie. Praha (2016).
- [32] MRAVINACOVÁ S.: Protinádorová léčiva doxorubicin a ellipticin a jejich transport ve formě nanočástic, Bakalářská práce, PŘF UK, katedra biochemie. Praha (2016).
- [33] DOSTÁLOVÁ S., MÜNZOVÁ D., VACULOVÍČOVÁ M. a KIZEK R.: Delivery of doxorubicin using protein nanocarriers. *J. Metallomics and Nanotechnologies*, **4**, 34-38 (2014).
- [34] SULTANA S., KHAN M. R., KUMAR M., KUMAR S. a ALI M.: Nanoparticles-mediated drug delivery approaches for cancer targeting: a review. *J. Drug Targeting*, **21**, 107-125 (2013).
- [35] DOSTÁLOVÁ S., VACULOVÍČOVÁ M., ADAM V. a KIZEK R.: Viry jako nanotransportéry léčiv. *J. Metallomics and Nanotechnologies*, **1**, 30-35 (2014).
- [36] GOSH P., HAN G., DE M., KIM C. K., ROTELLO V. M.: Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **60**, 1307-1315 (2008).
- [37] PANKHURST Q. A., CONNOLLY J., JONES S. K., DOBSON J.: Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **36**, 1307-1315 (2003).

- [38] SANVICENS N. a MARCO M. P.: Multifunctional nanoparticles – Properties and prospects for their use in human medicine. *Trends Biotechnol.*, **26**, 425-433 (2008).
- [39] MICHALET X., PINAUD F. F., BENTOLILA L. A., TSAY J. M., DOOSE S., SUNDARESAN G., WU A. M. a GAMBHIR S. S.: Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **307**, 538-544 (2005).
- [40] FERRAZ M. P., MONTEIRO F. J. a MANUEL C. M.: Hydroxyapatite nanoparticles: A review of preparation methodologies. *J. Appl. Biomater. Biomech.*, **2**, 74-80 (2004).
- [41] HALEY B. a FRENKEL E.: Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urol. Oncol.: Semin. Orig. Invest.*, **26**, 57-64 (2006).
- [42] LIU Z., TABAKMAN S., WESHLER K. a DAI H.: Carbon nanotubes in biology and medicine: In vitro and in vivo detection, imaging and drug delivery. *Nano Res.*, **2**, 85-120 (2009).
- [43] REILLY R. M.: Carbon nanotubes: Potential benefits and risks of nanotechnology in nuclear medicine. *J. Nucl. Med.*, **48**, 1039-1042 (2007).
- [44] SINGH R. a LILLARD Jr. J. W.: Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp. Mol. Pathol.*, **86**, 215-223 (2009).
- [45] GILLIES E. R. a FRÉCHET J. M. J.: Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discovery Today*, **10**, 35-43 (2005).
- [46] LEE J. S. a FEIJEN. J.: Polymersomes for drug delivery: Design, formation and characterization. *J. Controlled Release*, **161**, 473-483 (2012).

- [47] ELZOGHBY A. O., SAMY W. M. a ELGINDY N. A.: Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *J. Controlled Release*, **157**, 168-182 (2012).
- [48] DOSTÁLOVÁ S., ČERNÁ T., HYNEK D., KOUDELKOVÁ Z., VACULOVÍČ T., KOPEL P., HRABĚTA J., HEGER Z., VACULOVÍČOVÁ M., ECKSCHLAGER T., ADAM V. a STIBOROVÁ M.: Site-directed conjugation of antibodies to apoferritin nanocarrier for targeted drug delivery to prostate cancer cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **8**, 14430-14441 (2016).
- [49] YAN F., ZHANG Y., YUAN H., GREGAS M. K. a VO-DINH T.: Apoferritin protein cages: A novel drug nanocarrier for photodynamic therapy. *Chem. Commun.*, **38**, 4579-4581 (2008).
- [50] DANHIER P., BAŇSKI P., PAYEN V. L., GRASSO D., IPPOLITO L., SONVEAUX P. a PORPORATO P. E.: Cancer metabolism in space and time: Beyond the Warburg effect. *Biochim. Biophys. Acta*, **1858**, 556-572 (2017).
- [51] KOLEKTIV AUTORŮ: *Biochemie*, skriptum PŘF UK. *Základní kurz*. 4. vydání. Praha: Karolinum (2009).
- [52] DOSTÁLOVÁ S., VAŠÍČKOVÁ K., HYNEK D., KŘÍŽKOVÁ S., RICHTERA L., VACULOVÍČOVÁ M., ECKSCHLAGER T., STIBOROVÁ M., HEGER Z. a ADAM V.: Apoferritin as an ubiquitous nanocarrier with excellent shelf life. *Int. J. Nanomed.*, **12**, 2265-2278 (2017).

„Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.“

[illegible]